



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Instituto de Nanobiotecnología (NANOBIOTEC, UBA-CONICET);
Departamento de Tecnología Farmacéutica (FFYB, UBA)

Tesis doctoral:

**ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE TRIPTANOS
CON MEMBRANAS LIPÍDICAS Y SU
ENCAPSULACIÓN EN MICELAS POLIMÉRICAS
MEDIANTE SIMULACIONES DE DINÁMICA
MOLECULAR**

Candidata a doctora: Bioq. Farm. Irene Wood

Directora: Dra. Mónica Pickholz

2015

A Ari y mis hermosos sobrinos

**“Mucha gente pequeña,
en lugares pequeños,
haciendo cosas pequeñas
puede cambiar el mundo”.**

Eduardo Galeano

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar la experiencia. Poder haber empezado, transcurrido, vivido y terminado esta experiencia es algo único. No solo se trata de adquirir y difundir conocimiento objetivo. No es una carrera más, es una experiencia de vida, donde nos enfrentamos con lo mejor y lo peor de nosotros mismos, aprendemos a vivir intensamente, a pensar, a comunicar, a equivocarnos y a estar en lo cierto.

Quiero agradecer a Moni, mi directora (Mónica para los amigos). Te agradezco el aprendizaje y las experiencias. Dejarme ser y hacer y confiar. Por confiar en mí. Por enseñarme a hacer y a responder, a no tener miedo, a imaginar, a hablar en múltiples lenguajes y múltiples idiomas, y en simultáneo. Creo yo que fue un camino de aprendizaje para las dos, día a día, aprender a conocernos, a trabajar juntas, a relacionarnos y comunicarnos. Gracias. Gracias por leer y discutir conmigo esta tesis y por tu apoyo.

No me quiero olvidar de Flor, de su pasión por el conocimiento, por ser madre y celestina (real y potencial). Gracias por compartir conmigo tu sed de conocimiento, tu pasión por programas, TICS, herramientas, tu amor a las membranas. Gracias por tu compañerismo y calidez humana.

A mis “hermanitos”, jóvenes y recientes compañeros, Juan y Galo, por sus locuras, sus corchos, bonsai, retratos imaginarios, sus rankings, por robarme el mate, la yerba, la comida, por compartir el mate y reinos, por burlarse de mí y de mi manera de demostrar cariño. Por ser compañeros y acompañarnos.

A los vecinos biotecnos, a Julieta, Katia, Romina y Fernanda; a Marcelo, Luis, Florencia y Héctor; 6 años de renegar, de conversaciones, pasillos, almuerzos y conquistas (el dispenser!!).

A la gente con la que trabajé y me enseñó cosas, me prestó material, me ayudó: Lucas y Beta por “alojarme y bancarme” en el RMN, gracias Lucas por tu pasión (cuando te encontré, como cuesta!) y por tu paciencia; a los brasileros: Gabi, Eneida, Verónica, Márcio, Lúgia, Daniele, Pedro, Cristiano, Leo, Fernando, ustedes me enseñaron y ayudaron a terminar esta tesis,

compartieron tiempo conmigo y conversaron en portugués: ADOREI!; a Lucas y Walter por prestarme el sonicador; a Katia por ayudarme fiel y firmemente; a Romina y a Julieta por prestarme material y lugar.

Al laboratorio LAFEDAR por donar (mucho) sumatriptan para hacer los experimentos.

A la facultad: por darme lugar, conocimiento, enseñarme, permitir ser parte y sentir con orgullo que soy estudiante de la UBA, que estudié, enseñé y trabajé en la UBA. A la educación pública en general, por existir, la defendiendo a capa y espada. A ANPCyT, MinCyT, FONCyT, CONICET, gracias por las becas y subsidios que hicieron posible que haga y termine el doctorado.

A toda mi familia por el apoyo incondicional, por el aguante, la ayuda, la unión y el cariño. Gracias viejos por los valores que tengo, por la educación, por enseñarme a encarar todo con respeto y sobretodo por el amor. A mis hermanos; gracias Lu por ser tan cariñosa y tan compañera. A mis sobrinos, son hermosos y me hacen muy feliz. A mis tíos, tías, primos y abuelo. Gracias a mi nueva familia uruguaya por recibirme y brindarme siempre tanto amor.

A mis amigos por estar siempre, por las cenas, las vacaciones, los viajes, la vida misma: Vero, Vir, Leti, Milton, Chelo, Marie, Lau, Clau, Marian.

A mis pasiones: el fútbol, las artesanías y la vitrofusión. Gracias por ayudarme a desconectar mis pensamientos, por alejarme de la rumia y de la computadora, por ayudarme a conectar con mi cuerpo y creatividad. Gracias a toda la gente que los involucra.

Un GRACIAS especial y con mayúsculas a Ari. Por tu amor y tu compañerismo, por tus consejos, por enseñarme y compartir. Y por enseñarme a compartir y a disfrutar la vida con vos. Por nuestra felicidad y nuestros proyectos. Por ir y venir y no parar y viajar y salir. Por todas las pasiones que compartimos. Por ser tan parecidos y a veces tan distintos. GRACIAS MI AMOR, GRACIAS TOTALES.

Y gracias a la vida que me ha dado tanto!!

RESUMEN

En la terapia antimigrañosa actual se utilizan principalmente los triptanos, una familia de fármacos diseñados a partir de la estructura de serotonina (5-HT). Si bien representan una opción terapéutica selectiva por su actividad como agonistas de receptores 5-HT₁, los triptanos tienen dificultad para atravesar la barrera hemato-encefálica (BHE) y acceder a receptores localizados en el sistema nervioso central. A pesar del amplio uso del prototipo sumatriptan, un considerable número de pacientes presenta efectos adversos después de su administración oral, tornando el tratamiento insatisfactorio. La formulación comercial disponible para vía subcutánea presenta mayor biodisponibilidad pero requiere de varias administraciones diarias y un riguroso control de la dosis. Por este motivo, en los últimos tiempos se vienen proponiendo soluciones nanotecnológicas para vehiculizar el fármaco, con el fin de mejorar su farmacocinética y biodisponibilidad. Por ejemplo, los poloxámeros son ampliamente utilizados para la vehiculización de diferentes agentes terapéuticos y podrían ser una alternativa viable de encapsulación de sumatriptan para liberación prolongada. Las principales ventajas de estos materiales están relacionadas con su micelización termo-reversible y su anfifilicidad, que permite la interacción con membranas e incluso podría favorecer la permeación de fármacos.

En esta tesis llevamos adelante simulaciones de dinámica molecular a nivel atomístico con el fin de entender el comportamiento de triptanos en membranas modelo. Mediante esta técnica caracterizamos la distribución de estos compuestos y sus principales interacciones en un sistema biomimético. Observamos que la interfase, formada por las cabezas polares de fosfatidilcolina y la fase acuosa, cumple un papel clave en el anclaje de triptanos y otros compuestos con estructura indólica. Los grupos fosfato y colina, a través de múltiples interacciones, favorecieron la distribución interfacial de los compuestos indólicos.

El trabajo con membranas modelo nos ofreció una visión integral de la partición de triptanos y otros compuestos a través de membranas, como la BHE. A diferencia del sistema *n*-octanol/agua habitualmente utilizado, las bicapas modelo representaron detalladamente el comportamiento

anisotrópico de una membrana. Además, nos permitieron comprender el rol de distintas regiones como las cabezas polares y las cadenas hidrocarbonadas y caracterizar su diferente densidad, grado de orden, movilidad y perfil electrostático, entre otras. Confirmamos experimentalmente la interacción de sumatriptan con grupos de cabeza polar. Por ejemplo, el cambio de movilidad de los grupos fosfato y colina en presencia de sumatriptan, indicó la interacción superficial del fármaco.

La distribución de los compuestos indólicos observada en este trabajo es consistente con la existencia de sistemas transportadores utilizados por compuestos endógenos en la BHE. El comportamiento de los triptanos, sugirió que podrían requerir de algún compuesto que facilite su permeación o incluso de un sistema transportador para atravesar la BHE.

Por otro lado, los modelos que utilizamos en este trabajo nos permitieron estudiar sistemas y procesos caracterizados por diferentes escalas temporales y de tamaño. Propusimos modelos a escala grano grueso para realizar simulaciones de sumatriptan y poloxámeros en diferentes ambientes. Estos modelos resultaron adecuados para estudiar la agregación de poloxámeros en fase acuosa y la encapsulación de sumatriptan en micelas poliméricas, en condiciones similares a ensayos experimentales previos. La encapsulación de sumatriptan podría realizarse por distintos métodos, sugiriendo que las micelas poliméricas son vehiculizadores adecuados y estables para este fármaco. Los poloxámeros estudiados mostraron capacidad para interactuar con la bicapa lipídica y/o el agua, dependiendo de las condiciones iniciales y su balance hidrofílico-lipofílico. En las condiciones estudiadas, la presencia de los co-polímeros propuestos no afectó la distribución del fármaco sumatriptan en la membrana.

Estudios adicionales serían necesarios para dilucidar diferentes condiciones, concentraciones y combinaciones de poloxámeros, y así obtener una visión más completa de la encapsulación y liberación del fármaco sumatriptan y los posibles mecanismos por los cuales su permeación podría ser favorecida.

INDICE

Introducción	1
Membranas biológicas	1
Membranas modelo	3
Simulaciones en membranas modelo: interacción de compuestos con membranas	5
Migraña	7
Implicancia de serotonina en la migraña	8
Transporte a través de la barrera hemato-encefálica	8
Tratamiento de la migraña	10
Acceso de triptanos al sistema nervioso central	12
Formulaciones de triptanos	13
Nano-sistemas de administración de fármacos	14
Referencias	17
 Metodología: Simulaciones de Dinámica Molecular	 21
Dinámica Molecular	21
Fundamentos de la Dinámica Molecular	21
Aproximación clásica	22
Mecánica estadística. Promedios en una simulación	24
Potenciales de interacción	25
Algoritmos de integración	28
Condiciones periódicas de contorno	31
Simulaciones	32
Termostatos y barostatos	33
Niveles de descripción y campos de fuerza	34
1. Simulaciones atomísticas	34
2. Simulaciones a escala grano grueso	40
Referencias	42
 Capítulo 1: Interacción de compuestos endógenos con membranas modelo	 47
Motivación	47
Rol del triptofano	48

Simulaciones	49
Análisis de los resultados	51
Conclusiones	60
Referencias	61
Capítulo 2: Efecto de la concentración de sumatriptan en membranas modelo	63
Motivación	63
Simulaciones	64
Análisis de resultados	64
Conclusiones	72
Referencias	74
Capítulo 3: Efecto de las condiciones iniciales y el estado de ionización de naratriptan en membranas modelo	75
Motivación	75
Simulaciones	76
Análisis de resultados	76
Conclusiones	86
Referencias	87
Capítulo 4: Comparación de triptanos protonados	89
Motivación	89
1. Simulaciones: triptanos en fase acuosa	90
Análisis de los resultados	90
2. Simulaciones: triptanos en membrana	97
Análisis de los resultados	97
Conclusiones	98
Referencias	100
Capítulo 5: Modelos <i>coarse grain</i> de sumatriptan y poloxámeros	101
Motivación	101
1. Desarrollo del modelo de sumatriptan	102
Ajuste del modelo de triptofano	102
Diseño y ajuste del modelo para el fármaco sumatriptan	102

2. Modelo de poloxámeros	105
Auto-ensamblaje de F127 en solución acuosa	106
Estructura pre-ensamblada de F127 en solución acuosa	108
Interacción de sumatriptan con F127 en solución acuosa	110
Conclusiones	112
Referencias	113
Capítulo 6: Interacción de co-polímeros con membranas modelo	115
Motivación	115
1. Simulaciones de poloxámeros	116
Análisis de resultados	117
2. Simulaciones con sumatriptan. Resultados preliminares	123
Conclusiones	125
Referencias	127
Capítulo 7: Interacción sumatriptan-fosfatidilcolina mediante técnicas experimentales	129
Motivación	129
Preparación de vesículas lipídicas	130
Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	132
Análisis de resultados: RMN	134
Difracción de rayos X de bajo ángulo (<i>SAXS</i>)	138
Análisis de resultados: <i>SAXS</i>	140
Conclusiones	142
Referencias	143
Conclusiones y perspectivas	145

INTRODUCCIÓN

En la presente tesis buscamos, en forma global, comprender el comportamiento de fármacos antimigrañosos (triptanos) en membranas para entender su capacidad de atravesar la barrera hemato-encefálica y ayudar en el diseño de nuevos sistemas de liberación con nano-materiales, que favorezcan su permeación.

En esta dirección estudiamos, mediante simulaciones de dinámica molecular, la interacción de triptanos en bicapas lipídicas modelo y otros entornos. Realizamos simulaciones en distintos niveles de resolución, dependiendo del tamaño del sistema y la escala temporal del fenómeno en estudio. Complementamos las simulaciones mediante el abordaje experimental, realizando medidas de resonancia magnética nuclear y difracción de rayos X de triptanos en vesículas lipídicas, para profundizar la comprensión del comportamiento dinámico de los sistemas.

Los temas de interés de este trabajo de tesis y las metodologías necesarias para cumplir los objetivos planteados, están enmarcados en el área de la biología estructural. Las herramientas experimentales más utilizadas en este área incluyen difracción de rayos X, resonancia magnética nuclear, microscopía electrónica, distintas técnicas espectroscópicas, expresión proteica, entre otras [1]. En esta dirección, las técnicas de simulación computacional, capaces de acceder a fenómenos biológicos a nivel molecular y atómico, cumplen un rol fundamental en la comprensión y predicción de los fenómenos y la interpretación de datos experimentales.

Membranas biológicas

En cuanto a su función biológica y fisiológica, las membranas son estructuras esenciales para los organismos celulares. Proporcionan una barrera semi-permeable entre el interior y el exterior celular, definiendo los límites de una célula o compartimento y regulando el flujo de entrada y salida de materiales para mantener la homeostasis celular [2].

La forma de organización de los componentes en membranas fue descripta en los años 1970 mediante el modelo de mosaico fluido, propuesto por Singer y Nicolson [3], que representa

adecuadamente la mayor parte de las membranas biológicas. Su esqueleto es una bicapa lipídica de 5-10nm de espesor -una matriz dinámica y fluida a temperatura fisiológica-, en la cual están inmersas algunas proteínas -mayormente canales y receptores- (figura I.1). Este modelo permite entender propiedades físico-químicas como la flexibilidad y el comportamiento como líquido bidimensional.

Los lípidos más abundantes en las membranas biológicas son los fosfolípidos, además de esfingolípidos, glicolípidos y esteroides [4]. Todos ellos son insolubles en agua y solubles en solvente orgánico. Los fosfolípidos son moléculas anfipáticas compuestas por un grupo glicerol esterificado con dos ácidos grasos y un grupo fosfato, unido a su vez a un grupo de cabeza variable. En las membranas biológicas los grupos de cabeza son derivados de alcoholes polares, por ejemplo, colina, serina y etanolamina. Los ácidos grasos -en su mayoría de 14 a 20 átomos de carbono, saturados, insaturados o poliinsaturados- constituyen las colas hidrócarbonadas. La composición y estructura de los grupos de cabeza y colas en los fosfolípidos afecta la densidad de empaquetamiento y el área superficial por lípido [4].

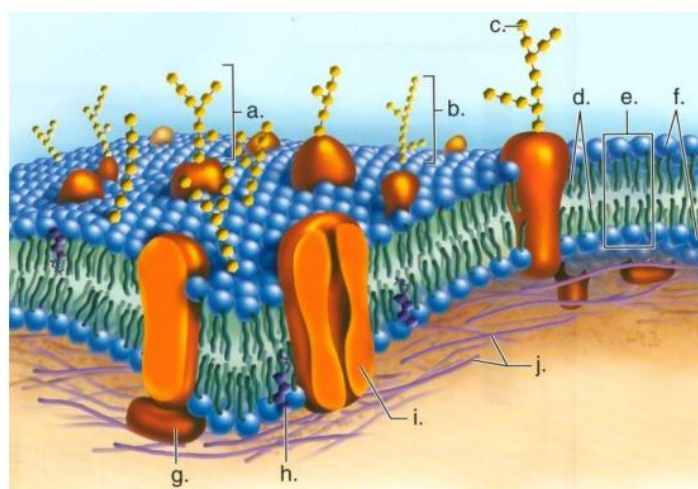


Figura I.1. Esquema de una membrana biológica y sus componentes: a) y c) oligosacáridos asociados a proteínas de membrana (glicoproteínas), b) glicolípido, d) colas hidrócarbonadas de lípidos, e) estructura de bicapa lipídica, f) cabezas polares de lípidos, g) proteína periférica, h) colesterol, i) proteína integral de membrana y j) citoesqueleto [5].

La distribución y los tipos de lípidos -y proteínas de membrana- varían entre las distintas células y compartimentos celulares, permitiendo la adaptación o especialización a los requisitos específicos de la célula u organela.

Dentro de las estructuras tipo bicapa, los lípidos pueden adoptar diferentes fases, que se diferencian en su grado de organización. El estado fluido de las membranas es el más relevante fisiológicamente [2]. La mayoría de las membranas biológicas se encuentran en este estado, a pesar de que sus propiedades físicas pueden ser alteradas por la presencia de proteínas y colesterol.

Dentro de las membranas biológicas, los lípidos –y también las proteínas- pueden difundir dentro del plano de la membrana. Incluso pueden cambiar su orientación de una monocapa a otra (*flip-flop*), como mecanismo de señalización o para regular la composición de la membrana [2]. En una bicapa pura, este evento es considerablemente raro en ausencia de enzimas flipasas.

Membranas modelo

Los fosfolípidos forman distintos agregados en medio acuoso, en función de su estructura (figura I.2) [6]. La agregación y separación de fases se produce por la fuerte capacidad del agua de formar enlaces de hidrógeno con otras moléculas polares, especialmente otras moléculas de agua. Las colas hidrocarbonadas (hidrofóbicas) no forman enlaces de hidrógeno con el agua y, por lo tanto, son excluidas de ella.



Figura I.2. Agregados lipídicos en medio acuoso (adaptado de [7]).

Los lípidos con grupos de cabeza voluminosos (surfactantes) tienden –a partir de una concentración determinada- a formar micelas en solución, donde las cabezas polares están en la

superficie en contacto con el entorno acuoso. Otro tipo de agregado es la bicapa, que se forma cuando los grupos de colas y cabeza tienen similar área transversal. Las colas hidrocarbonadas de una monocapa lipídica se orientan hacia las colas de la otra monocapa y los grupos de cabeza polar (hidrofilicos) interactúan con el ambiente acuoso. Las bicapas exponen grupos hidrófobicos en los bordes, por lo que, para estabilizar su estructura, pueden plegarse sobre sí mismas y formar vesículas o liposomas, con una cavidad acuosa en su interior.

Dada la complejidad y variabilidad de las membranas biológicas, el estudio de sistemas modelo es de gran utilidad desde el punto de vista de la investigación básica para obtener información estructural, dinámica y funcional de sus componentes [6]. Las membranas modelo (figura I.2) están constituidas por lípidos puros, mezclas de lípidos, proteínas reconstruidas en lípidos y hasta mezclas de lípidos y fármacos. Diferentes tipos de membranas modelo conservan la propiedad fundamental de las membranas biológicas: están organizadas en estructura de bicapa.

Los fosfolípidos con cabeza polar fosfatidil-colina (PC) son los más abundantes, junto con etanolamina (PE), en las membranas de mamíferos [8]. Dentro de ellos, las cadenas aciladas 16:0 y 18:1 son también muy abundantes. Es importante destacar que, por ejemplo, sistemas complejos como la barrera hemato-encefálica (BHE), al igual que otras membranas biológicas, contienen diversos tipos de lípidos, además de proteínas y esteroides. Específicamente, las membranas celulares cerebrales y la BHE tienen una gran abundancia en lípidos como POPC (figura I.3), lo cual justifica la elección de este lípido para entender procesos que suceden en dichas membranas [9, 10]. Además, las bicapas de POPC se utilizan habitualmente para estudiar la permeación y la difusión de varios tipos de moléculas y fármacos, como membranas simplificadas modelo de BHE [11].

Por ejemplo, en este trabajo de tesis estudiamos sistemas modelo de membrana (bicapas y vesículas) compuestos de un fosfolípido abundante: lecitina o fosfatidil-colina (PC). Para las simulaciones usamos el lípido (POPC) y para los experimentos PC de huevo (*eggPC*, *EPC*). El componente más abundante de *EPC* es 1-palmitoil-2-oleoil PC [12], por lo que POPC es un

excelente sustituto sintético de *EPC*, justificando la comparación de las simulaciones y las determinaciones experimentales, como discutiremos más adelante.

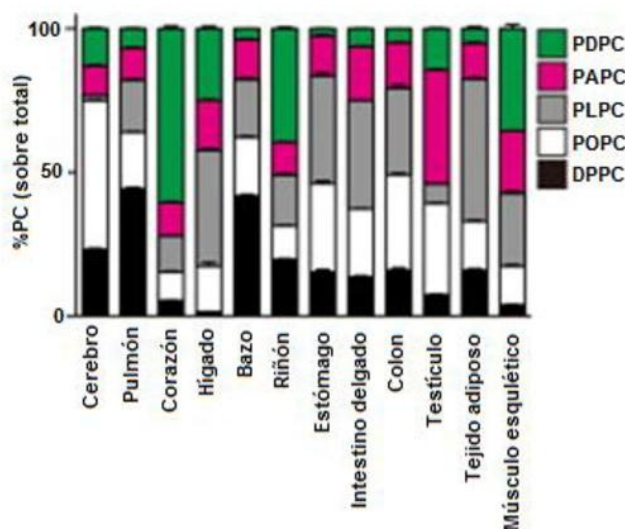


Figura I.3. Composición de lípidos en diversas membranas celulares de mamífero [adaptado de 10].

Simulaciones en membranas modelo: interacción de compuestos con membranas

Esta tesis involucra el trabajo con membranas modelo. Particularmente, por simulaciones computacionales se puede acceder a varios procesos que ocurren en membranas (transporte, difusión, permeación, partición, orientación, agregación) y a la información termodinámica y cinética asociada a ellos. Podemos así, estudiar la capacidad de un fármaco de difundir libremente a través de membranas [13-15], como la BHE.

El conocimiento de las interacciones bicapa-fármaco en membranas modelo permite predecir propiedades farmacocinéticas, como el mecanismo de transporte [15-18]. Esto lo convierte en un campo de gran interés en investigación básica y aplicada y en el área de desarrollo en la industria farmacéutica.

Habitualmente, en la literatura se correlaciona la capacidad de difusión de un fármaco a través de membranas con su coeficiente de partición en *n*-octanol/agua (logP) y su concentración, ya que el transporte es proporcional al gradiente de concentración a través de la membrana [19, 20]. Por ejemplo, Fischer *et al* sugieren que algunos fármacos anfífilos/hidrofílicos (por ejemplo, el prototipo de los triptanos) sólo cruzan la membrana en la BHE cuando son aplicados a altas

concentraciones [11]. El coeficiente de partición y la concentración no son los únicos factores influyentes en la asociación de fármacos con membranas y su difusión (figura I.4).

Por ejemplo, la anfifilicidad es un requisito para la asociación de compuestos a membranas, pero no es suficiente para favorecer su permeación [11], ya que puede favorecer la auto-agregación molecular [21]. También, algunos autores sugieren que para que haya permeación debe haber pérdida o deslocalización de carga [11, 22].

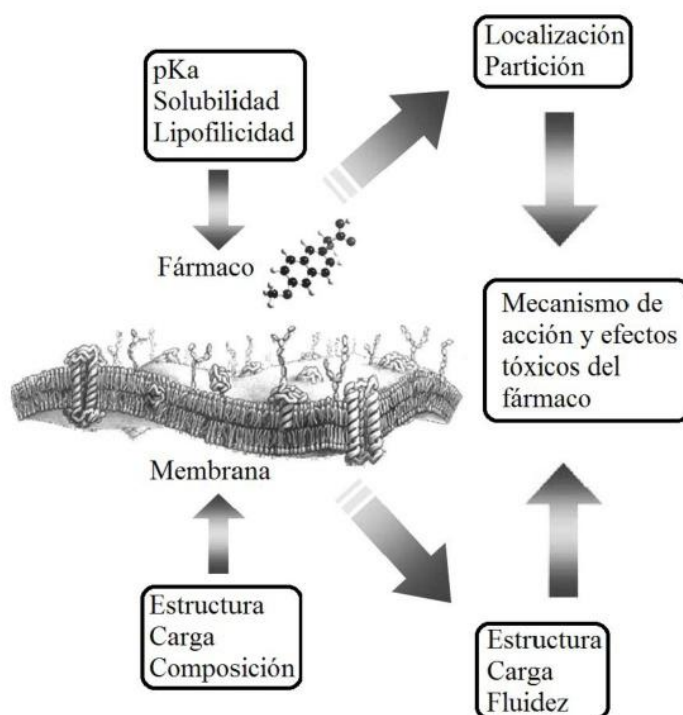


Figura I.4. Factores que influyen en la interacción fármaco-membrana [adaptado de 18].

Austin *et al* observaron que los sustituyentes amina de compuestos farmacológicos (presentes en triptanos), tienen alto grado de asociación a la bicapa, a pesar de su baja partición en *n*-octanol-agua [23]. La asociación a la bicapa se estabiliza por interacciones electrostáticas con los grupos de cabeza polar. Sin embargo, la permeabilidad del fármaco también depende de la estructura, el grado de sustitución y el estado de ionización [24, 25].

Por último, la partición de un fármaco puede perturbar propiedades dinámicas y fisico-químicas de la membrana: fluidez, permeabilidad, grado de orden, grado de hidratación y orientación de las cabezas polares y potencial electrostático [26]. Estas propiedades pueden ser cuantificadas

por simulaciones. Específicamente, nuestro interés es estudiar el comportamiento de fármacos antimigrañosos, pertenecientes a la familia de los triptanos, en membranas modelo. A continuación haremos una breve revisión de la migraña y su farmacología.

Migraña

La migraña es un síndrome crónico multifactorial, que afecta a un 12% de la población mundial [27], siendo más de la mitad mujeres. Se caracteriza por episodios agudos de cefalea intensa -con variación intra e interindividual [28]-, acompañada de varios síntomas, como náuseas, vómitos y sensibilidad a la luz, los sonidos y el movimiento [29]. El criterio diagnóstico desarrollado por la Sociedad Internacional de Cefaleas (*International Headache Society, IHS*) se basa en las características de la cefalea y los síntomas acompañantes [30] (cuadro I.1).

En algunos pacientes los episodios de cefalea están precedidos de un síntoma neurológico transitorio, llamado aura, que se expresa en forma visual y puede incluir deficiencias motoras y del habla [31, 32].

Cuadro I.1. Criterio diagnóstico de migraña según la *IHS* (adaptado de [28]).

Diagnóstico de migraña
Episodios de cefalea en las últimas 4 a 72 horas
Presentación de dos de los siguientes síntomas:
- dolor unilateral pulsátil
- agravado por el movimiento
- intensidad moderada a severa
Presentación de uno de los siguientes síntomas:
- náuseas o vómitos
- fotofobia o fonofobia

La etiología y el mecanismo fisiopatológico de la migraña son objeto de debate [33]. Las posturas se dividen entre la etiología vascular [34] y la neuronal [35, 36]. La teoría neuronal explica la localización hemi-craneana del dolor [28], la activación trigeminal [33] y la extravasación neurogénica de sustancias vasoactivas [28, 34]. Una visión amplia define a la

migraña como una forma de cefalea neuro-vascular: los eventos neuronales causan vasodilatación que, a su vez, se traduce en dolor y en mayor activación neuronal [28].

Implicancia de serotonina en la migraña

La participación del neurotransmisor serotonina (5-hidroxi-triptamina, 5-HT) en la migraña fue descrita por primera vez tras hallar un aumento en la excreción urinaria de su metabolito principal, el ácido 5-hidroxi-indol-acético (5-HIA), durante episodios de migraña [27]. Una baja disponibilidad de 5-HT y/o un repentino aumento de su liberación, fueron considerados eventos desencadenantes de estos episodios [37]. También se observaron alteraciones del sistema serotoninérgico en otros trastornos, como ansiedad, depresión y psicosis [38].

En condiciones fisiológicas, 5-HT está implicada en numerosos procesos, mediante la activación de múltiples receptores. El extenso estudio sobre los receptores 5-HT, permitió identificar la subclase 5-HT_{1B} en vasos craneales y algunas terminales nerviosas [39, 40]. Su identificación permitió desarrollar la farmacoterapia de la migraña y comprender el rol de 5-HT en sistemas vasculares y neuronales relacionados con la cefalea [40, 41].

Para que 5-HT y compuestos relacionados puedan activar los receptores de la subclase 5-HT_{1B}, deben atravesar la BHE. Dicha barrera es una estructura altamente protectora, que regula el pasaje e intercambio de sustancias, nutrientes y metabolitos entre el torrente sanguíneo y el sistema nervioso central (SNC) [42, 43]. El endotelio de los capilares cerebrales es el componente morfológico principal de la BHE [44] y su membrana plasmática, representada por su bicapa lipídica, actúa como la principal barrera de difusión de sustancias a nivel molecular [45].

Transporte a través de la barrera hemato-encefálica

El endotelio de la BHE tiene la particularidad de presentar uniones estrechas (*tight junctions*) entre células adyacentes, obstaculizando el pasaje paracelular de sustancias [46] (figura I.5). Por lo tanto, las moléculas con acción en el SNC tienen que valerse de otra vía para atravesar la bicapa lipídica de las células endoteliales cerebrales.

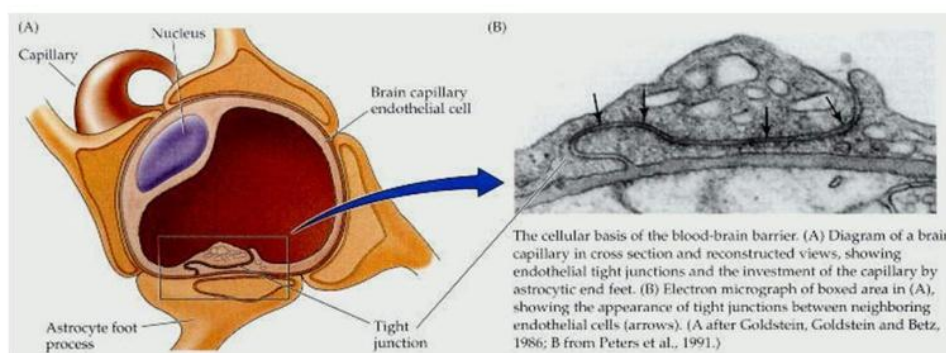


Figura I.5. A) Esquema de un capilar cerebral y las células endoteliales. B) Micrografía electrónica del área correspondiente a las uniones estrechas entre células adyacentes [46].

La vía de pasaje transcelular cobra vital importancia en la BHE. Dentro de esta vía, la difusión pasiva y la utilización de sistemas transportadores (proteínas transportadoras ó transcitosis mediada por receptor), son los mecanismos de pasaje más utilizados por los compuestos endógenos y terapéuticos con acción central [11, 47, 48] (figura I.6).

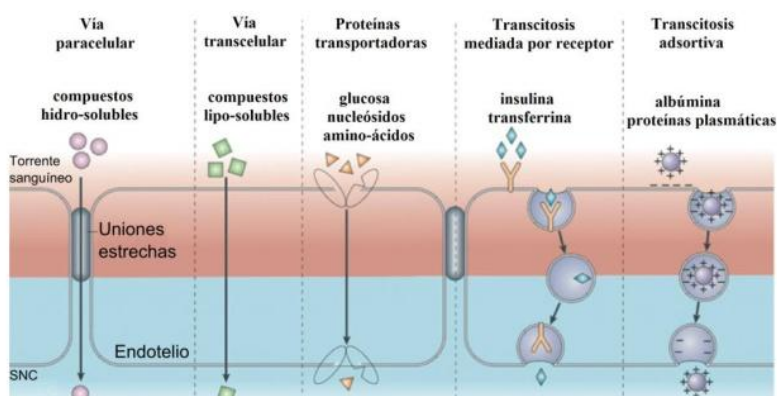


Figura I.6. Mecanismos de pasaje de sustancias a través de la BHE. La vía paracelular es muy rara en BHE [adaptado de 49].

Respecto de la difusión pasiva, ciertas características estructurales favorecen el pasaje de compuestos químicos a través de la BHE. Entre ellas se destacan: elevada lipofiliidad (estimada por logP [50]), grupos funcionales rígidos, escasos grupos polares (dadores y aceptores de enlaces de hidrógeno), falta de carga formal y área accesible a solvente reducida ($<80 \text{ \AA}^2$) [47, 51, 52].

Por otro lado, numerosos compuestos, incluyendo nutrientes y compuestos hidrofílicos, utilizan sistemas transportadores para acceder al SNC [53]. Por ejemplo, las proteínas transportadoras de aminoácidos voluminosos neutros, L, y de aminoácidos catiónicos, y⁺, en la BHE [54], tienen

amplia especificidad para sustratos relativamente voluminosos y podrían transportar fármacos (L-dopa). También existen sistemas de transporte de fármacos catiónicos y de cationes orgánicos [53]. Además, en la BHE, el mecanismo activo es utilizado también para reducir la concentración de fármacos en el SNC, como un mecanismo de detoxificación [55].

En el caso del sistema serotoninérgico, tanto 5-HT como su precursor triptófano (Trp), acceden al SNC a través de la BHE mediante un proceso facilitado por transportador. El pasaje del aminoácido Trp está mediado por el transportador *LAT-1 (large and neutral amino acid, LNAA)*, perteneciente a la familia L. *LAT-1* es utilizado por Trp y otros aminoácidos (Phe, Tyr, Leu e Ile) [56], por lo que el transporte de Trp depende la concentración y afinidad de los aminoácidos neutros [42, 57]. Por su parte, 5-HT utiliza el transportador selectivo de serotonina (*serotonin transporter, SERT*), localizado en la membrana celular del endotelio capilar cerebral [58], que está involucrado en el transporte desde y hacia el SNC.

Tratamiento de la migraña

Hace varios años, la farmacoterapia de la migraña fue protagonizada por los derivados ergóticos o *ergot* [59], principalmente por su bajo costo. Las principales desventajas de uno de los *ergot* más utilizados, la dihidroergotamina (DHE) -farmacocinética errática y potentes efectos adversos por la vasoconstricción generalizada [28]- promovieron el desarrollo de una farmacoterapia más segura. De esta manera, en las décadas de 1980 y 1990 se desarrolló una familia de fármacos antimigrañosos selectivos, los triptanos, diseñados en base a la estructura de serotonina (figura I.7) [37, 60].

Sumatriptan (SMT), el prototipo de los triptanos, fue el primero en ser diseñado (figura I.7). SMT fue desarrollado para imitar la acción de 5-HT y resolver los efectos secundarios de DHE [61]. Su farmacología es muy selectiva: actúa como agonista de receptores 5-HT₁ localizados, principal pero no exclusivamente, en la vasculatura craneal [39]. A diferencia de DHE, SMT es inactivo en todos los otros receptores 5-HT, en los receptores α_1 y α_2 -adrenérgicos, β -adrenérgicos, dopaminérgicos, colinérgicos y muscarínicos [28, 39, 62, 63]. La aparición de

SMT significa, además de una excelente opción terapéutica, una valiosa herramienta en investigación ya que permite entender la fisiopatología de la migraña y el papel de 5-HT [33, 39, 64].

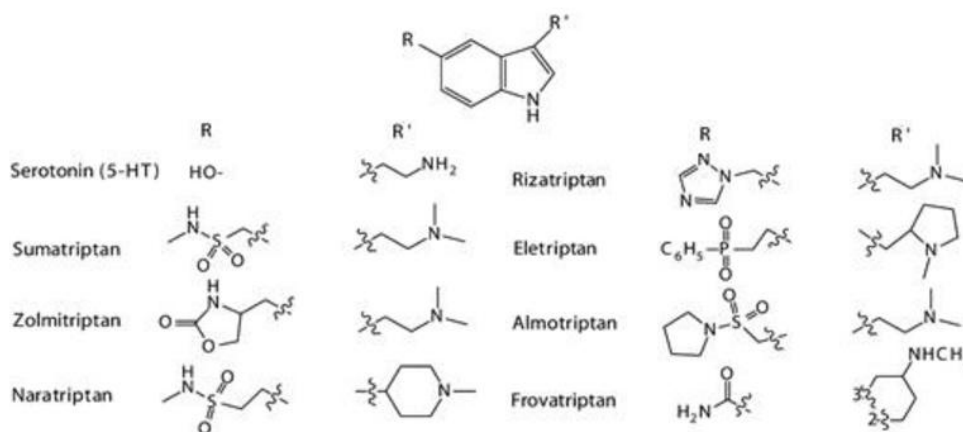


Figura I.7. Estructura comparativa del esqueleto indólico de serotonina y triptanos disponibles [65].

SMT actúa como agente vasoconstrictor selectivo en vasos sanguíneos craneales [33, 37, 39, 62, 66-68], además de bloquear la extravasación de plasma, la liberación de sustancias vasoactivas (inflamación neurogénica) y la neurotransmisión trigeminal (receptores en núcleos neuronales, nocicepción central) [28, 41, 63, 67, 69] (figura I.8).

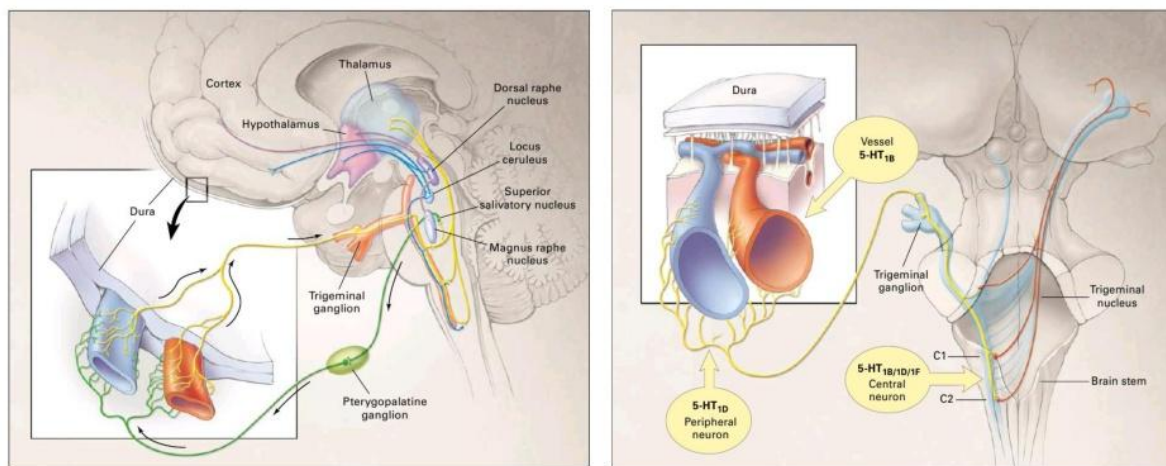


Figura I.8. Áreas involucradas en el mecanismo fisiopatológico de la migraña (izquierda) y probables blancos de acción de SMT y otros triptanos (derecha) [28].

Los triptanos disponibles en el mercado se desarrollaron tomando a SMT como referencia para comparar la eficacia, tolerabilidad y seguridad [61] (figura I.7). Todos ellos muestran afinidad

por los receptores 5-HT_{1B} (cráneo-vasculares) y 1D (trigeminales) [70], la mayoría también por 5-HT_{1F} (trigeminales) [41, 71] (figura I.8). Los 5-HT_{1D} son auto-receptores inhibitorios situados a nivel periférico y central, en las terminales trigeminales y en centrales nerviosas de la vía de transmisión del dolor [69, 72]. Si bien los mecanismos de acción de los triptanos no están plenamente dilucidados [28], tienen en común la modulación de la síntesis de 5-HT en vías del dolor. La importancia de cada uno de los tres potenciales mecanismos de acción - vasoconstricción craneal, inhibición trigeminal periférica y central [28]- también es incierta [34, 61].

Los efectos adversos (EA) de los triptanos se clasifican por su implicancia clínica. Los EA de menor gravedad son inespecíficos. Los más importantes son dolor en el pecho, mareos, entumecimiento, hormigueo, somnolencia y fatiga [63, 72], y en su mayoría están relacionados con la acción central [72]. Los EA a nivel cardiovascular están relacionados con la presencia de receptores 5-HT_{1B} en las arterias coronarias [41, 73], limitan el uso de triptanos en pacientes con enfermedades cardíacas y vasculares [28] e incrementan el interés en desarrollar sistemas de liberación novedosos. En particular, se postula que la incidencia de EA centrales depende de la afinidad de unión a los receptores, de la lipofiliidad del fármaco [74] y de sus metabolitos activos [29, 72].

Acceso de triptanos al sistema nervioso central

Como ya discutimos, la fisiopatología de la migraña y el mecanismo de acción de triptanos continúan siendo tema de debate en la literatura. Ambos debates plantean la controversia entre la capacidad de atravesar la BHE y la eficacia de los triptanos. Dado que la mayor población de receptores 5-HT_{1B,D,F} está en el SNC, el pasaje a través de BHE podría ser determinante para la eficacia, comprometiendo la seguridad farmacológica [71, 74].

La permeabilidad a través de membranas biológicas es uno de los determinantes más importantes en la farmacocinética de un fármaco [48]. Una de las principales limitaciones de triptanos como SMT, es su falta de eficacia lejos de los episodios, durante la fase de aura [41], relacionada con

la dificultad de atravesar la BHE por un mecanismo de difusión, debido a su baja solubilidad lipídica [33]. En cambio, se postula en la literatura que triptanos más nuevos como naratriptan (NRT), podrían atravesar la BHE, por su coeficiente de partición [71]. Sin embargo, las diferencias de lipofilidad entre triptanos no son considerables, excepto para eletriptán (ELE) [50, 74]. Comparado con SMT, ELE tiene mayor biodisponibilidad oral, pero similar dosis y afinidad por 5-HT₁ [41]. ELE es sustrato de P-glicoproteína (P-gp), una bomba de eflujo ampliamente distribuida en BHE [41, 74].

Durante los episodios de migraña la integridad de la BHE [33, 41, 71, 75, 76] podría verse afectada por la inflamación neurogénica local [50]. Esta condición circunstancial justifica la acción central y los EA centrales observados para SMT [39, 75]. Eventualmente, los triptanos menos lipofílicos podrían valerse de un mecanismo facilitado por transportador para atravesar la BHE. Por ejemplo, algunos autores sugieren que SMT podría utilizar un transportador de compuestos orgánicos [77].

Formulaciones de triptanos

Todos los triptanos actualmente disponibles en el mercado se comercializan en forma de comprimidos orales. Específicamente, SMT presenta varias formas además de los comprimidos orales [81]: atomizador nasal [78], inyección subcutánea (sc) [79], parches transdérmicos [80] y comprimidos con naproxeno [82]. La formulación más eficaz y con inicio de acción más rápido de SMT es la inyección sc [29, 81, 83]. Sin embargo, SMT sc presenta elevado costo y efectos adversos (EA) locales, relacionados con la vía de administración [29, 63]. Las formulaciones intranasal y oral tienen una eficacia similar. La forma intranasal presenta un inicio de acción más rápido, pero su duración de acción es limitada [81]. Entre todas las formulaciones, SMT oral tiene la biodisponibilidad más baja [72]. De esta manera, SMT continúa siendo la opción terapéutica más versátil y de uso más amplio debido a sus múltiples formulaciones. A pesar de la limitación de SMT para atravesar la BHE en circunstancias normales y sus efectos adversos ya mencionados, ningún otro triptano mejoró hasta ahora sus efectos farmacológicos.

La vía sc es la opción de primera elección en pacientes que presentan vómitos o durante los episodios, cuando se requiere un inicio ultra rápido de acción [28, 70]. Sin embargo, la formulación comercial sc disponible requiere de varias administraciones diarias (alta recurrencia) y un riguroso control de la dosis. En la actualidad se vienen proponiendo soluciones nano-tecnológicas a través de la vehiculización del SMT en nano-transportadores, con el fin de mejorar su farmacocinética y biodisponibilidad.

Por otro lado, si bien SMT es la primera elección en la mayoría de los pacientes, no existe el triptano ideal [63, 70] y se han creado guías para ayudar a los médicos a elegir el mejor triptano y la mejor forma de administración para cada paciente [63]. El desarrollo de nuevas formulaciones debe centrarse en lograr rápida absorción [83], inicio rápido de acción, máxima eficacia y biodisponibilidad, prevenir la recurrencia y reducir el perfil de EA [61], idealmente sin efectos vasculares [28].

Nano-sistemas de administración de fármacos

El campo de la investigación farmacéutica se desarrolló enormemente en los últimos años, en miras de crear sistemas inteligentes de vehiculización y liberación de fármacos y compuestos bioactivos [84]. Para ello se desarrollaron múltiples y novedosos nano-materiales y formas de administración con cualidades especiales. Entre ellas, podemos mencionar la capacidad de controlar la liberación, proteger de factores externos, direccionar a sitios específicos, mejorar aspectos farmacocinéticos y organolépticos y aumentar la estabilidad farmacológica.

Los materiales que están siendo estudiados incluyen micelas poliméricas, complejos de polímero-DNA, nanogeles, liposomas, etc. Este tipo de materiales representan una oportunidad extraordinaria para la liberación segura y eficiente de fármacos, genes y una gran variedad de moléculas [85-87]. Un ejemplo muy prometedor de materiales poliméricos formulados en la nano-escala para uso farmacéutico, son los co-polímeros tribloque de la serie denominada poloxámeros [88]. Estos polímeros, conocidos como Pluronic[®], son capaces de interactuar con membranas biológicas modificando algunas de sus propiedades y facilitando la permeación de

fármacos a través de membranas y barreras [89]. Por otro lado, son compuestos bio-degradables y sus datos de toxicidad indican que son bien tolerados por el organismo [90, 91]. Algunos poloxámeros son termo-reversibles: presentan temperatura de micelización próxima a la temperatura ambiente [92-94] y gelación próxima a la temperatura corporal [95]. La termo-reversibilidad de estos materiales está fundamentada en la dependencia del grado de hidratación de sus monómeros con la temperatura. Esta propiedad es extremadamente útil cuando, por ejemplo, se propone una vía de administración *sc* [91, 96, 97] o intranasal [98], favoreciendo la formación de un sistema de liberación prolongada *in situ* [99]. Las formas de liberación prolongada permiten extender el tiempo de cesión del principio activo a partir de la forma de dosificación. De esta manera se controla la frecuencia de administración del fármaco y su liberación para que se realice de acuerdo con una cinética preestablecida y reproducible.

En este contexto, el conocimiento detallado del mecanismo de encapsulación (y/o liberación) a nivel atómico/molecular puede ayudar en el diseño de formas eficientes de encapsulación de acuerdo con el objetivo deseado en cada caso específico.

De manera global, mediante simulaciones de dinámica molecular, podremos entender los mecanismos involucrados en la interacción triptano-membrana y en la encapsulación de triptanos en matrices poliméricas, para así asistir en el diseño, la composición y proporción de los componentes en vías de mejorar la formulación. Para comprender la interacción y la encapsulación de fármacos es importante conocer su estructura. En ese sentido, diversas técnicas experimentales se utilizan para obtener información de estos sistemas con resolución de algunos Å. Las simulaciones computacionales son una herramienta única para acceder a información estructural y dinámica de estos sistemas a nivel atómico, y será la metodología principal en este trabajo de tesis. Inicialmente, buscamos entender la relación entre algunas propiedades físico-químicas y estructurales de triptanos y el comportamiento en un medio heterogéneo, anisotrópico y anfipático como es una bicapa lipídica. Además, considerando el gran esfuerzo dedicado al

desarrollo de formulaciones poliméricas eficaces y seguras de fármacos encapsulados, las simulaciones computacionales podrán suministrar información valiosa para el avance de este proceso.

Por otro lado, resulta importante estudiar la influencia de la composición y propiedades como el balance hidrofílico-lipofílico (BHL) de los poloxámeros en su interacción con membranas modelo y triptanos para poder plantear el diseño de formas eficientes de vehiculización. En este contexto, el grupo de la Dra. Araujo [100-102] estudió experimentalmente la encapsulación de SMT en micelas poliméricas para administración subcutánea. Se hizo hincapié en la preparación, caracterización y liberación del fármaco de sistemas micelares en función de la composición de Pluronic[®] y la concentración de SMT.

Finalmente, la revisión de los antecedentes converge hacia la necesidad de mejorar las formulaciones de triptanos actualmente disponibles. La encapsulación de triptanos en matrices poliméricas podría mejorar sustancialmente su farmacocinética e inclusive su eficacia. Por ejemplo, en el caso de SMT, debido a la corta duración del efecto analgésico y la falta de adherencia terapéutica. Proponemos asistir desde el punto de vista computacional el desarrollo de la formulación de SMT de liberación controlada para administración subcutánea, compuesta de co-polímeros de tribloque.

Para garantizar la posibilidad de su administración por vía inyectable, la formulación debería ser líquida a temperatura ambiente (micelas simples o mixtas) y formar un depósito (hidrogel) en el sitio de administración. Desde allí, SMT se liberaría en forma controlada y prolongada. La propiedad de micelización y gelación termo-reversible de los poloxámeros hacen posible esta estrategia. Las micelas poliméricas con elevada concentración de poloxámeros mediana o altamente hidrofílicos serían capaces de encapsular SMT (fármaco hidrofílico) en la zona de la corona micelar. SMT se distribuiría en los espacios intersticiales de la estructura de hidrogel.

En resumen, la formulación subcutánea propuesta proporcionaría las siguientes ventajas: formación *in situ* de un sistema de liberación controlada, reducción de dosis y EA, disminución de la tasa de recurrencia y la frecuencia de administraciones, mejora en la adherencia y la eficacia terapéutica. Además, la posibilidad de formar micelas e hidrogeles mixtos favorecería el control de la presencia del fármaco, la disminución de toxicidad y, eventualmente, el pasaje de SMT (o ELE) a través de la BHE.

En los siguientes capítulos describimos la metodología y los principales resultados enmarcados en este trabajo de tesis. Finalmente discutiremos las conclusiones más destacadas y las perspectivas que se plantean a partir de este trabajo.

REFERENCIAS

1. Verli, H., *Bioinformática da Biologia à flexibilidade molecular*. Porto Alegre, Brasil, 2014. 1.
2. Gurr, M.I., J.L. Harwood, and K.N. Frayn, *Lipid biochemistry*. 2002: Springer.
3. Singer, S. and G.L. Nicolson, *The fluid mosaic model of the structure of cell membranes*. Day and Good Membranes and viruses in immunopathology, 1972: p. 7-47.
4. Yeagle, P.L., *Lipid regulation of cell membrane structure and function*. The FASEB journal, 1989. 3(7): p. 1833-1842.
5. Mader, S. and M. Windelspecht, *Biology*. 2015: McGraw-Hill Education.
6. Pabst, G., et al., *Liposomes, Lipid Bilayers and Model Membranes: From Basic Research to Application*. 2014: Taylor & Francis.
7. Bitounis, D., et al., *Optimizing druggability through liposomal formulations: new approaches to an old concept*. ISRN pharmaceutics, 2012. 2012.
8. van Meer, G., D.R. Voelker, and G.W. Feigenson, *Membrane lipids: where they are and how they behave*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. 9(2): p. 112-124.
9. Selivonchick, D. and B. Roots, *Lipid and fatty acyl composition of rat brain capillary endothelia isolated by a new technique*. Lipids, 1977. 12(2): p. 165-169.
10. Harayama, T., et al., *Lysophospholipid Acyltransferases Mediate Phosphatidylcholine Diversification to Achieve the Physical Properties Required In Vivo*. Cell Metabolism, 2014. 20(2): p. 295-305.
11. Fischer, H., R. Gottschlich, and A. Seelig, *Blood-Brain Barrier Permeation: Molecular Parameters Governing Passive Diffusion*. The Journal of Membrane Biology, 1998. 165(3): p. 201-211.
12. lipids, a., <http://www.avantilipids.com/>.
13. Bassolino-Klimas, D., H.E. Alper, and T.R. Stouch, *Solute diffusion in lipid bilayer membranes: an atomic level study by molecular dynamics simulation*. Biochemistry, 1993. 32(47): p. 12624-12637.
14. Alper, H.E. and T.R. Stouch, *Orientation and Diffusion of a Drug Analog in Biomembranes: Molecular Dynamics Simulations*. The Journal of Physical Chemistry, 1995. 99(15): p. 5724-5731.
15. Boggara, M.B. and R. Krishnamoorti, *Partitioning of Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs in Lipid Membranes: A Molecular Dynamics Simulation Study*. Biophysical Journal, 2010. 98(4): p. 586-595.
16. Peetla, C., A. Stine, and V. Labhasetwar, *Biophysical Interactions with Model Lipid Membranes: Applications in Drug Discovery and Drug Delivery*. Molecular Pharmaceutics, 2009. 6(5): p. 1264-1276.
17. Loverde, S.M., *Molecular simulation of the transport of drugs across model membranes*. The Journal of Physical Chemistry Letters, 2014. 5(10): p. 1659-1665.
18. Lucio, M., J.L.F.C. Lima, and S. Reis, *Drug-Membrane Interactions: Significance for Medicinal Chemistry*. Current Medicinal Chemistry, 2010. 17(17): p. 1795-1809.
19. Buckley, S.T., et al., *In vitro models to evaluate the permeability of poorly soluble drug entities: Challenges and perspectives*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2012. 45(3): p. 235-250.

20. Kang, M. and S.M. Loverde, *Molecular Simulation of the Concentration-Dependent Interaction of Hydrophobic Drugs with Model Cellular Membranes*. The Journal of Physical Chemistry B, 2014. **118**(41): p. 11965-11972.
21. Schreier, S., S.V.P. Malheiros, and E. de Paula, *Surface active drugs: self-association and interaction with membranes and surfactants. Physicochemical and biological aspects*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2000. **1508**(1-2): p. 210-234.
22. Malheiros, S.V.P., et al., *A new look at the hemolytic effect of local anesthetics, considering their real membrane/water partitioning at pH 7.4*. Biophysical Chemistry, 2004. **110**(3): p. 213-221.
23. Austin, R., et al., *The Thermodynamics of the Partitioning of Ionizing Molecules Between Aqueous Buffers and Phospholipid Membranes*. Pharmaceutical Research, 2005. **22**(10): p. 1649-1657.
24. Bernardi, R.C., et al., *Molecular dynamics study of biomembrane/local anesthetics interactions*. Molecular Physics, 2009. **107**(14): p. 1437-1443.
25. Austin, R.P., A.M. Davis, and C.N. Manners, *Partitioning of ionizing molecules between aqueous buffers and phospholipid vesicles*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1995. **84**(10): p. 1180-1183.
26. Boggara, M.B., M. Mihailescu, and R. Krishnamoorti, *Structural Association of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs with Lipid Membranes*. Journal of the American Chemical Society, 2012. **134**(48): p. 19669-19676.
27. Hamel, E., *Serotonin and migraine: biology and clinical implications*. Cephalalgia, 2007. **27**(11): p. 1293-1300.
28. Goadsby, P.J., R.B. Lipton, and M.D. Ferrari, *Migraine — Current Understanding and Treatment*. New England Journal of Medicine, 2002. **346**(4): p. 257-270.
29. Adelman, J.U. and E.J. Lewit, *Comparative aspects of triptans in treating migraine*. Clinical Cornerstone, 2001. **4**(3): p. 53-64.
30. Silberstein, S., et al., *The International Classification of Headache Disorders, 2nd Edition (ICHD-II)—revision of criteria for 8.2 Medication-overuse headache*. Cephalalgia, 2005. **25**(6): p. 460-465.
31. Ferrari, M.D., et al., *Oral triptans (serotonin 5-HT_{1B/1D} agonists) in acute migraine treatment: a meta-analysis of 53 trials*. The Lancet. **358**(9294): p. 1668-1675.
32. Pietrobon, D. and J. Striessnig, *Neurobiology of migraine*. Nat Rev Neurosci, 2003. **4**(5): p. 386-398.
33. Kaube, H., K.L. Hoskin, and P.J. Goadsby, *Inhibition by sumatriptan of central trigeminal neurones only after blood-brain barrier disruption*. British Journal of Pharmacology, 1993. **109**(3): p. 788-792.
34. Humphrey, P. and P. Goadsby, *The Mode of Action of Sumatriptan is Vascular? A Debate*. Cephalalgia, 1994. **14**(6): p. 401-410.
35. Goadsby, P.J., et al., *Neurobiology of migraine*. Neuroscience, 2009. **161**(2): p. 327-341.
36. Goadsby, P.J., *The vascular theory of migraine—a great story wrecked by the facts*. Brain, 2009. **132**(1): p. 6-7.
37. Humphrey, P.P.A., et al., *Serotonin and Migraine*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1990. **600**(1): p. 587-598.
38. Gijsman, H.J., et al., *A review of the role of serotonin receptors in psychiatric disorders*. Human Psychopharmacology, 2000. **15**(6): p. 397-415.
39. Humphrey, P.P.A., et al., *Preclinical studies on the anti-migraine drug, Sumatriptan*. European Neurology, 1991. **31**(5): p. 282-290.
40. Humphrey, P.P.A., *The discovery and development of the triptans, a major therapeutic breakthrough*. Headache, 2008. **48**(5): p. 685-687.
41. Goadsby, P.J., *The pharmacology of headache*. Progress in Neurobiology, 2000. **62**(5): p. 509-525.
42. Pardridge, W.M., *Blood-brain barrier carrier-mediated transport and brain metabolism of amino acids*. Neurochemical Research, 1998. **23**(5): p. 635-644.
43. Rubin, L.L. and J.M. Staddon, *THE CELL BIOLOGY OF THE BLOOD-BRAIN BARRIER*. Annual Review of Neuroscience, 1999. **22**(1): p. 11-28.
44. Bourne, G.H., *The Structure and Function of Nervous Tissue: Structure III and Physiology III*. 1972: Academic Press.
45. Seelig, A., *The role of size and charge for blood-brain barrier permeation of drugs and fatty acids*. Journal of molecular neuroscience, 2007. **33**(1): p. 32-41.
46. A.L. Betz, a and G.W. Goldstein, *Specialized Properties and Solute Transport in Brain Capillaries*. Annual Review of Physiology, 1986. **48**(1): p. 241-250.
47. Goodwin, J.T. and D.E. Clark, *In silico predictions of blood-brain barrier penetration: considerations to "keep in mind"*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2005. **315**(2): p. 477-483.
48. Sugano, K., et al., *Coexistence of passive and carrier-mediated processes in drug transport*. Nat Rev Drug Discov, 2010. **9**(8): p. 597-614.
49. Löscher, W. and H. Potschka, *Drug resistance in brain diseases and the role of drug efflux transporters*. Nature Reviews Neuroscience, 2005. **6**(8): p. 591-602.
50. Lambert, G.A., *Preclinical neuropharmacology of naratriptan*. CNS Drug Reviews, 2005. **11**(3): p. 289-

- 316.
51. Lipinski, C.A., et al., *Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings*. *Advanced drug delivery reviews*, 2012. **64**: p. 4-17.
 52. Clark, D.E., *Computational prediction of blood-brain barrier permeation*. *Annual reports in medicinal chemistry*, 2005. **40**: p. 403-415.
 53. Tamai, I. and A. Tsuji, *Transporter-mediated permeation of drugs across the blood-brain barrier*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2000. **89**(11): p. 1371-1388.
 54. Hawkins, R.A., et al., *Structure of the Blood-Brain Barrier and Its Role in the Transport of Amino Acids*. *The Journal of Nutrition*, 2006. **136**(1): p. 218S-226S.
 55. Fischer, H., R. Gottschlich, and A. Seelig, *Blood-brain barrier permeation: Molecular parameters governing passive diffusion*. *Journal of Membrane Biology*, 1998. **165**(3): p. 201-211.
 56. Hargreaves, K.M. and W.M. Pardridge, *Neutral amino acid transport at the human blood-brain barrier*. *Journal of Biological Chemistry*, 1988. **263**(36): p. 19392-19397.
 57. Boado, R.J., et al., *Selective expression of the large neutral amino acid transporter at the blood-brain barrier*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999. **96**(21): p. 12079-12084.
 58. Ohtsuki, S., *New aspects of the blood-brain barrier transporters; its physiological roles in the central nervous system*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2004. **27**(10): p. 1489-1496.
 59. Baron, E.P., *Headache, Cerebral Aneurysms, and the Use of Triptans and Ergot Derivatives*. *Headache: The Journal of Head and Face Pain*, 2015. **55**(5): p. 739-747.
 60. Peroutka, S.J. and B.G. McCarthy, *Sumatriptan (GR 43175) interacts selectively with 5-HT_{1B} and 5-HT_{1D} binding sites*. *European Journal of Pharmacology*, 1989. **163**(1): p. 133-136.
 61. Goadsby, P., *Serotonin 5-HT_{1B/1D} Receptor Agonists in Migraine*. *CNS Drugs*, 1998. **10**(4): p. 271-286.
 62. Peroutka, S.J., *Sumatriptan in acute migraine: Pharmacology and review of world experience*. *Headache*, 1990. **30**(SUPPL. 2): p. 554-560.
 63. Dodick, D.W., S. Silberstein, and C.G.H. Dahlöf, *Is there a preferred triptan?* *Headache*, 2002. **42**(1): p. 1-7.
 64. Cady, R., *Looking forward: The expanding utility of sumatriptan and naratriptan*. *Cephalalgia, Supplement*, 2001. **21**(1): p. 35-38.
 65. Yu, A.-M., *Indolealkylamines: Biotransformations and Potential Drug-Drug Interactions*. *The AAPS Journal*, 2008. **10**(2): p. 242-253.
 66. Buzzi, M.G., et al., *Further characterization of the putative 5-HT receptor which mediates blockade of neurogenic plasma extravasation in rat dura mater*. *British Journal of Pharmacology*, 1991. **103**(2): p. 1421-1428.
 67. Humphrey, P.P.A. and P.J. Goadsby, *The mode of action of sumatriptan is vascular? A debate*. *Cephalalgia*, 1994. **14**(6): p. 401-410.
 68. Saxena, P.R. and P. Tfelt-Hansen, *Success and failure of triptans*. *Journal of Headache and Pain*, 2001. **2**(1): p. 3-11.
 69. Bigal, M.E., et al., *The triptan formulations: A critical evaluation*. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, 2003. **61**(2 A): p. 313-320.
 70. Rapoport, A. and S. Tepper, *All triptans are not the same*. *The Journal of Headache and Pain*, 2001. **2**(1): p. s87-s92.
 71. Connor, H., *Building on the Sumatriptan Experience: The Development of Naratriptan*. *Cephalalgia*, 2001. **21**(1 suppl): p. 32-34.
 72. Dodick, D.W. and V. Martin, *Triptans and CNS side-effects: pharmacokinetic and metabolic mechanisms*. *Cephalalgia*, 2004. **24**(6): p. 417-424.
 73. Dodick, D.W., et al., *Cardiovascular Tolerability and Safety of Triptans: A Review of Clinical Data*. *Headache: The Journal of Head and Face Pain*, 2004. **44**: p. S20-S30.
 74. Pascual, J. and P. Muñoz, *Correlation between lipophilicity and triptan outcomes*. *Headache*, 2005. **45**(1): p. 3-6.
 75. Edvinsson, L. and P. Tfelt-Hansen, *The Blood-Brain Barrier in Migraine Treatment*. *Cephalalgia*, 2008. **28**(12): p. 1245-1258.
 76. Tfelt-Hansen, P., *Does sumatriptan cross the blood-brain barrier in animals and man?* *The Journal of Headache and Pain*, 2010. **11**(1): p. 5-12.
 77. Cheng, Z., et al., *Hydrophilic anti-migraine triptans are substrates for OATP1A2, a transporter expressed at human blood-brain barrier*. *Xenobiotica*, 2012. **42**(9): p. 880-890.
 78. Ryan, R., et al., *Sumatriptan nasal spray for the acute treatment of migraine: Results of two clinical studies*. *Neurology*, 1997. **49**(5): p. 1225-1230.
 79. Cady, R.K., et al., *Treatment of acute migraine with subcutaneous sumatriptan*. *JAMA*, 1991. **265**(21): p. 2831-2835.
 80. Pierce, M.W., *Transdermal Delivery of Sumatriptan for the Treatment of Acute Migraine*.

- Neurotherapeutics, 2010. 7(2): p. 159-163.
81. Tfelt-Hansen, P., *Efficacy and Adverse Events of Subcutaneous, Oral, and Intranasal Sumatriptan Used for Migraine Treatment: A Systematic Review Based on Number Needed To Treat*. *Cephalalgia*, 1998. 18(8): p. 532-538.
 82. Smith, T.R., et al., *Sumatriptan and Naproxen Sodium for the Acute Treatment of Migraine*. *Headache: The Journal of Head and Face Pain*, 2005. 45(8): p. 983-991.
 83. Tfelt-Hansen, P., *Parenteral vs. oral sumatriptan and naratriptan: plasma levels and efficacy in migraine. A comment*. *The Journal of Headache and Pain*, 2007. 8(5): p. 273-276.
 84. Alvarez-Lorenzo, C. and A. Concheiro, *Smart drug delivery systems: from fundamentals to the clinic*. *Chemical Communications*, 2014. 50(58): p. 7743-7765.
 85. Kabanov, A.V., E.V. Batrakova, and V.Y. Alakhov, *Pluronic® block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery*. *Journal of controlled release*, 2002. 82(2): p. 189-212.
 86. Kabanov, A.V. and V.Y. Alakhov, *Pluronic® block copolymers in drug delivery: From micellar nanocontainers to biological response modifiers*. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 2002. 19(1).
 87. Torchilin, V.P., *Micellar nanocarriers: pharmaceutical perspectives*. *Pharmaceutical research*, 2007. 24(1): p. 1-16.
 88. Batrakova, E.V. and A.V. Kabanov, *Pluronic block copolymers: Evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers*. *Journal of Controlled Release*, 2008. 130(2): p. 98-106.
 89. Krylova, O.O., et al., *Pluronic L61 accelerates flip-flop and transbilayer doxorubicin permeation*. *Chemistry-A European Journal*, 2003. 9(16): p. 3930-3936.
 90. Administration, F.F.a.D., *Inactive ingredient Database*. 2015.
 91. Jeong, B., et al., *Biodegradable block copolymers as injectable drug-delivery systems*. *Nature*, 1997. 388(6645): p. 860-862.
 92. Croy, S. and G. Kwon, *Polymeric micelles for drug delivery*. *Current pharmaceutical design*, 2006. 12(36): p. 4669-4684.
 93. Alakhov, V., et al., *Block copolymeric biotransport carriers as versatile vehicles for drug delivery*. *Expert opinion on biological therapy*, 2001. 1(4): p. 583-602.
 94. Jones, M.-C. and J.-C. Leroux, *Polymeric micelles – a new generation of colloidal drug carriers*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 1999. 48(2): p. 101-111.
 95. Li, L., et al., *Thermoreversible micellization and gelation of a blend of pluronic polymers*. *Polymer*, 2008. 49(7): p. 1952-1960.
 96. Barichello, J.M., et al., *Absorption of insulin from Pluronic F-127 gels following subcutaneous administration in rats*. *International Journal of Pharmaceutics*, 1999. 184(2): p. 189-198.
 97. Liu, Y., et al., *Controlled delivery of recombinant hirudin based on thermo-sensitive Pluronic® F127 hydrogel for subcutaneous administration: In vitro and in vivo characterization*. *Journal of Controlled Release*, 2007. 117(3): p. 387-395.
 98. Majithiya, R.J., et al., *Thermoreversible-mucoadhesive gel for nasal delivery of sumatriptan*. *AAPS PharmSciTech*, 2006. 7(3): p. E80-E86.
 99. Kibbe, A.H. and A. American Pharmaceutical, *Handbook of pharmaceutical excipients*. 2000, Washington, D.C.: American Pharmaceutical Association.
 100. Oshiro, A., et al., *Pluronic F-127/L-81 Binary Hydrogels as Drug-Delivery Systems: Influence of Physicochemical Aspects on Release Kinetics and Cytotoxicity*. *Langmuir*, 2014. 30(45): p. 13689-13698.
 101. Rodrigues, T et al., *Poloxamers as Drug-Delivery Systems: Physicochemical, Pharmaceutical, and Toxicological Aspects*. *Nanotoxicology - Materials, Methodologies, and Assessments.*, edited by Nelson Durán; Silvia S. Guterres; Oswaldo L. Alves; Springer., 2014.
 102. Allison, O., *PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SISTEMAS CARREADORES PARA LIBERAÇÃO MODIFICADA DE SUCCINATO DE SUMATRIPTANO DESTINADO AO TRATAMENTO DA MIGRÂNEA*. UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOSISTEMAS, 2013.

METODOLOGIA: SIMULACIONES DE DINÁMICA MOLECULAR

En este capítulo, presentamos algunos conceptos fundamentales de la principal técnica computacional que utilizamos en este trabajo de tesis: las simulaciones de dinámica molecular.

Dinámica Molecular

La técnica de Dinámica Molecular (DM) tiene una larga historia. Desde su creación hace varios años [1] y en la actualidad, constituye una herramienta teórica muy importante en física, química y biología. Gracias al creciente desarrollo del poder de cómputo, la técnica de DM se renueva continuamente, permitiendo estudiar sistemas cada vez más grandes y complejos y procesos más prolongados. Los temas de interés son cada vez más diversos y abarcan múltiples disciplinas, incluyendo el estudio de sistemas biológicos complejos (membranas modelo, proteínas, ácidos nucleicos, etc.) [2].

Por DM se puede estudiar con detalle atómico y/o molecular el comportamiento dinámico y los procesos que ocurren en muchos tipos de sistemas y estructuras [3]. La DM es de gran ayuda en la predicción y sobretodo la comprensión de fenómenos que ocurren en sistemas reales a través de sistemas modelo. Estos modelos consisten en la representación tridimensional de las estructuras de los sistemas estudiados, por lo que precisan una descripción espacial (coordenadas internas o cartesianas) y topológica (conectividad) de sus componentes [4].

Fundamentos de la Dinámica Molecular

La metodología está basada en los principios básicos de la mecánica clásica y la mecánica estadística [3, 4]. Permite determinar propiedades termodinámicas (TD), estructurales, de transporte, espectroscópicas y seguir caminos/coordenadas de reacción, de los sistemas y procesos en estudio. La sinergia entre abordajes computacionales y experimentales permite una comprensión más profunda de los sistemas de interés. La investigación experimental suele motivar estudios computacionales y, a su vez, los resultados obtenidos por simulaciones proporcionan explicaciones a nivel microscópico de los fenómenos observados experimentalmente.

Aproximación clásica

Las propiedades físicas de la materia se encuentran en su estructura y el movimiento de sus constituyentes básicos, núcleos y electrones. En principio, la dinámica de un sistema de partículas -un problema de muchos cuerpos- se puede obtener mediante la resolución de la ecuación de Schrödinger dependiente del tiempo, lo que da las probabilidades de encontrar las partículas en cualquier posición del espacio en un dado tiempo. En muchos casos, es posible desacoplar la función de onda de los electrones de la función de onda de los núcleos, de acuerdo con la aproximación de Born-Oppenheimer (debido a la diferencia de masas). Sin embargo, aun considerando dicha aproximación es imposible en la práctica resolver numéricamente la ecuación de Schrödinger y se debe recurrir a otras aproximaciones (Hartree Fock, Teoría del Funcional Densidad, etc). En particular, para sistemas biológicos (por lo menos miles de núcleos y electrones), resulta imposible su resolución aún bajo dichas aproximaciones.

En esa dirección, las simulaciones de DM son una herramienta muy potente para estudiar problemas de muchos cuerpos a nivel atomístico, basada en la mecánica clásica. En esta aproximación se resuelven numéricamente las ecuaciones de Newton. La principal ventaja es la simulación realística de materiales mediante la simplificación por potenciales de dos cuerpos con forma analítica.

Aun siendo la mecánica cuántica, en lugar de la mecánica clásica, la que describe la física fundamental de la materia condensada, la validez de la aproximación clásica puede ser evaluada en base a la longitud de onda térmica de Broglie definida por

$$\Lambda = \left[\frac{2\pi\hbar^2}{mK_B T} \right]^{1/2} \quad (\text{Ec. 1})$$

donde \hbar es la constante de Planck, m la masa átomo, K_B la constante de Boltzmann y T la temperatura. La aproximación clásica es válida para $\Lambda \ll a$, siendo a la separación del vecino más cercano. Bajo esta condición, todo el sistema puede ser tratado como un modelo de gas diluido basado en la formulación de la teoría cinética clásica. En este caso, cada átomo puede ser

considerado como una partícula.

La mayoría de los procesos biomoleculares pueden ser abordados por parametrizaciones semi-empíricas que describen las interacciones de pares entre las partículas del sistema con potenciales clásicos efectivos. Además de tener un costo computacional más bajo, los modelos clásicos ofrecen una adecuada descripción de los procesos e interacciones. Quedan excluidas del tratamiento clásico las reacciones (formación y ruptura de enlaces) y las vibraciones de enlaces y ángulos con frecuencias muy altas.

La DM se emplea como medio de muestreo de un conjunto mecánico-estadístico, llamado *ensemble*. En las simulaciones de DM se obtiene información a nivel microscópico (posiciones y momentos o velocidades), a partir de la cual se obtienen observables macroscópicas, tales como presión y energía. Los *ensembles* están caracterizados por valores constantes de variables TD, que describen el estado TD de un sistema y las condiciones en las cuales se realiza un experimento computacional (temperatura (T), presión (P), número de partículas (N), etc.). Cada estado particular, definido por estos parámetros, tiene asociada una ecuación de estado que caracteriza al sistema.

El estado microscópico de un sistema se define por las posiciones y las velocidades de las partículas, que son las coordenadas de un espacio multidimensional: el espacio de las fases. Para un sistema de N partículas, este espacio tiene 6^N dimensiones (posiciones y velocidades). Un único punto en el espacio de las fases describe el estado del sistema. El *ensemble* es una colección de puntos en el espacio de las fases que cumple las condiciones de un estado TD particular. Las simulaciones de DM generan una secuencia de puntos (estados microscópicos) en el espacio de las fases en función del tiempo; estos puntos pertenecen al mismo *ensemble* y corresponden a las diferentes conformaciones del sistema. Los diferentes *ensembles* se describen a en la tabla M.1.

Tabla M.1. *Ensembles* y sus características

<i>Ensemble</i>	Energía (E)	Partículas (N)	Volumen (V)	Presión (P)	Temperatura (T)	Potencial químico (μ)
Microcanónico (sistema aislado) NVE	Constante	Constante	Constante	Variable	Variable	Variable
Canónico NVT	Variable	Constante	Constante	Variable	Constante	Variable
Isotérmico- isobárico NPT	Variable	Constante	Variable	Constante	Constante	Variable
Gran canónico μ VT	Variable	Variable	Constante	Variable	Constante	Constante

Mecánica estadística. Promedios en una simulación

Un experimento generalmente se hace sobre una muestra macroscópica que contiene un número extremadamente grande de átomos o moléculas en un enorme número de conformaciones. En mecánica estadística, se calcula el promedio del *ensemble* sobre un gran número de réplicas del sistema para obtener los observables del experimento, según

$$\langle A \rangle_{ensemble} = \iint dp^N dr^N A(p^N, r^N) \rho(p^N, r^N) \quad (\text{Ec. 2})$$

donde $A(p^N, r^N)$ es el observable de interés, expresado en función del momento (p) y de las posiciones (r). La integración se extiende a todas las variables posibles de r y p . $\rho(p^N, r^N)$ es la densidad de probabilidades del *ensemble*

$$\rho(p^N, r^N) = \frac{1}{Q} e^{\left[\frac{-H(p^N, r^N)}{K_B T} \right]} \quad (\text{Ec. 3})$$

donde H corresponde a la expresión del potencial (Hamiltoniano), T la temperatura, K_B la constante de Boltzmann y Q la función de partición:

$$Q = \iint dp^N dr^N e^{\left[\frac{-H(p^N, r^N)}{K_B T} \right]} \quad (\text{Ec. 4})$$

Esta integral es extremadamente difícil de calcular porque involucra todos los estados posibles del sistema. En una simulación de DM, los puntos del *ensemble* se calculan secuencialmente en el tiempo, por lo que para calcular una media del *ensemble*, las simulaciones deben pasar a través de todos los estados posibles correspondientes a las restricciones TD particulares. Lo que

habitualmente se hace es determinar un promedio temporal del observable A , que se expresa como

$$\langle A \rangle_{\text{tiempo}} = \lim_{t \rightarrow \infty} \frac{1}{t} \int_0^t A(p^N(t), r^N(t)) dt \sim \frac{1}{M} \sum_{t=1}^M A(p^N, r^N) \quad (\text{Ec. 5})$$

donde t es el tiempo de simulación, M el número de pasos en la simulación y $A(p^N, r^N)$ el valor instantáneo de A . Sin embargo, los observables experimentales son los promedios del *ensemble* y no los promedios temporales. La forma de resolver esta diferencia entre promedios temporales y promedios del *ensemble*, lleva a uno de los axiomas fundamentales de la mecánica estadística, la hipótesis ergódica, que establece

$$\langle \text{ensemble} \rangle = \langle \text{tiempo} \rangle$$

Al permitir que el sistema evolucione indefinidamente, pasaría a través de todos los estados posibles. Uno de los objetivos de una simulación DM es generar suficientes conformaciones representativas para cumplir esa igualdad y luego obtener información pertinente sobre propiedades estructurales, dinámicas y TD. Debido a que las simulaciones tienen una duración fija, se debe prolongar lo suficiente para asegurar el muestreo de suficientes conformaciones representativas del espacio de las fases.

Potenciales de interacción

Como ya comentamos, en DM las ecuaciones de movimiento clásicas (segunda Ley de Newton) son resueltas numéricamente para obtener configuraciones sucesivas del sistema en estudio. Como resultado de la integración de las ecuaciones de movimiento, se obtiene la variación temporal de las posiciones y velocidades (trayectorias) de todas las partículas del sistema. A partir de la trayectoria, se calculan los promedios temporales de las propiedades de interés.

El potencial se diferencia respecto a las coordenadas de las partículas, para obtener el valor y la dirección de la fuerza que actúa sobre cada partícula y por lo tanto puede ser utilizado en una simulación de DM.

El potencial se puede expresar como la suma de términos internos (interacciones

intramoleculares o de partículas unidas) y términos externos (interacciones intermoleculares o de partículas no unidas):

$$V = V_{\text{unidas}} + V_{\text{no unidas}} \quad (\text{Ec. 6})$$

Los términos de interacciones entre partículas unidas se dividen en tres tipos de movimientos, alrededor de enlaces, ángulos y diedros (figura M.1). Los potenciales que describen estos términos involucran partículas próximas espacialmente, por lo que su cálculo requiere de un costo computacional relativamente bajo.

$$V_{\text{unidas}} = V_{\text{estiramiento enlace}} + V_{\text{plegamiento ángulos}} + V_{\text{torsión diedros}} \quad (\text{Ec. 7})$$

Tanto los enlaces como los ángulos entre partículas unidas consecutivamente, pueden ser modelados a través de un potencial armónico (Ley de Hooke), considerados como resortes. La variación respecto de los valores de equilibrio r_0 y θ_0 , es penalizada energéticamente por un factor constante K_r y K_θ , respectivamente. Las constantes provienen de datos de espectroscopía infraroja o de cálculos cuánticos, mientras que las distancias y ángulos de equilibrio se obtienen de estructuras cristalinas de alta resolución o de técnicas espectroscópicas.

$$V_{\text{estiramiento enlaces}} = \sum K_r (r - r_0)^2 \quad (\text{Ec. 8})$$

$$V_{\text{plegamiento ángulos}} = \sum K_\theta (\theta - \theta_0)^2 \quad (\text{Ec. 9})$$

La torsión alrededor de los ángulos diedros formados por cuatro partículas unidas consecutivamente implica atravesar barreras estéricas (K_φ). El movimiento asociado es una rotación o torsión, descrito por un ángulo diedro φ , un valor de multiplicidad n -número de mínimos en la rotación alrededor del enlace central- y una fase χ -donde el ángulo pasa a través de un mínimo-. Este potencial se modela como una expansión de coseno

$$V_{\text{torsión diedros}} = \sum K_\varphi (1 - \cos(n\varphi - \chi)) \quad (\text{Ec. 10})$$

En algunos casos se incluyen otros términos, como el potencial diedro impropio, necesario para lograr una geometría plana (por ejemplo, en una unión amida).

El término $V_{\text{no unidas}}$ representa las interacciones entre partículas no ligadas o entre partículas

alejadas (pertenecientes a la misma molécula y separadas por tres o más enlaces). Estas interacciones reciben dos contribuciones: el potencial de van der Waals (vdW) y el electrostático.

$$V_{\text{no unidas}} = V_{\text{vdW}} + V_{\text{electrostático}} \quad (\text{Ec. 11})$$

La interacción de vdW entre dos partículas surge de un equilibrio entre fuerzas repulsivas y atractivas. Las fuerzas repulsivas aparecen a distancias cortas, donde la interacción electrón-electrón es fuerte, y se deben al principio de exclusión de Pauli. La fuerza de atracción surge de fluctuaciones en la distribución de carga en las nubes electrónicas. Estas fluctuaciones dan lugar a un dipolo instantáneo que, a su vez, induce un dipolo en una segunda partícula, dando lugar a la interacción atractiva. Estos dos efectos son significativos cuando la distancia disminuye. La interacción atractiva tiene mayor alcance que la repulsiva. La separación óptima de dos partículas es aproximadamente igual a la suma de sus radios de vdW.

$$V_{\text{vdW}} = \sum \left(\frac{A_{ik}}{r_{ik}^{12}} - \frac{C_{ik}}{r_{ik}^6} \right) \quad (\text{Ec. 12})$$

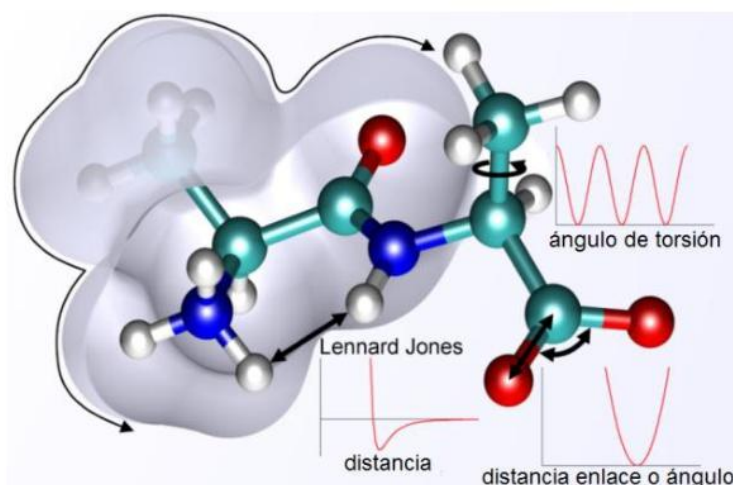


Figura M.1. Esquema de interacciones entre partículas unidas y no unidas (tipo vdW) (adaptado de [5]).

La interacción vdW se modela con un potencial de Lennard-Jones 6-12 (LJ) para cada par de partículas ik a una distancia r . El potencial de LJ se caracteriza por ser altamente repulsivo a distancias cortas (r^{12}) y atractivo a distancias relativamente largas (r^6). Los valores de las constantes A y C -distancias en las que el potencial es cero- pueden ser determinados por dispersión en cristales y fase gaseosa.

Por último, la interacción electrostática (figura M.2) entre un par de partículas depende de sus cargas parciales y es modelada por el potencial de Coulomb

$$V_{\text{electrostático}} = \sum \frac{q_i q_k}{D r_{ik}} \quad (\text{Ec. 13})$$

donde D es la constante dieléctrica del medio y r la distancia entre las partículas con cargas q_i y q_k .

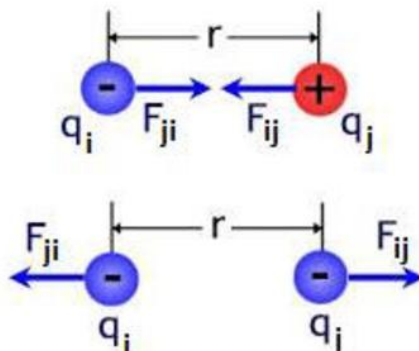


Figura M.2. Esquema de interacciones electrostáticas [5].

El término de interacción entre partículas no unidas se calcula para cada par de partículas, por lo que escala con N^2 y su cálculo constituye una de las partes más costosas de una simulación de DM. Para acelerar el cálculo, se ignoran las interacciones entre partículas separadas por una distancia mayor que una distancia predefinida de corte (*cut off*). Particularmente, la inclusión de las interacciones electrostáticas de largo alcance tiene un efecto crítico sobre el costo computacional por el aumento de la distancia de corte (lo discutiremos más adelante).

Algoritmos de integración

Como ya comentamos, los observables del sistema de interés, $A(p^N, r^N)$, pueden expresarse en función de las velocidades y las posiciones de las partículas del sistema, y la integración se extiende a todas las variables de r y p .

Para empezar, es necesario definir las posiciones y velocidades iniciales de los componentes del sistema. Existen muchas formas para obtener la configuración de posiciones iniciales, por ejemplo, mediante optimización de geometría a través de cálculos cuánticos [6] o a partir de la distribución aleatoria de las moléculas del sistema. Las posiciones iniciales muchas veces se obtienen,

por ejemplo para proteínas, a partir de estructuras experimentales -estructura cristalina por rayos X y estructura en solución por espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) (datos depositados en *Protein Data Bank, PDB*) [7].

La distribución inicial de velocidades se obtiene de una distribución aleatoria para una determinada temperatura (considerando ausencia de impulso). La distribución de Maxwell-Boltzmann describe la probabilidad de que una partícula i tenga una velocidad v en la dirección x a una temperatura T :

$$p(v_{ix}) = \sqrt{\frac{m_i}{2\pi K_B T}} e^{\left[-\frac{1}{2} \frac{m_i v_{ix}^2}{K_B T}\right]} \quad (\text{Ec. 14})$$

La temperatura se puede calcular a partir de las velocidades mediante la siguiente relación:

$$T = \frac{1}{K_B(3N)} \sum_{i=1}^N \frac{|p_i|^2}{2m_i} \quad (\text{Ec. 15})$$

A partir de aquí, la generación de trayectorias de DM es muy simple. Dadas las posiciones de todas las partículas del sistema, las fuerzas que actúan sobre ellas pueden ser calculadas por el gradiente del potencial

$$\vec{F} = -\nabla V(t) \quad (\text{Ec. 16})$$

De acuerdo con la segunda ley de Newton, podemos calcular la aceleración de cada átomo mediante

$$-\nabla V(t) = m\vec{a}(t) \quad (\text{Ec. 17})$$

siendo m la masa del átomo y \vec{a} su aceleración. La aceleración combina las posiciones y velocidades en un instante t , para calcular la posición y la velocidad en un instante $t + \Delta t$. Dadas las posiciones en este nuevo instante, los potenciales se vuelven a calcular, dando origen a nuevas fuerzas, nueva aceleración y por lo tanto, nuevas posiciones en un instante posterior. Al repetir este ciclo se obtiene la trayectoria de todas las partículas del sistema, es decir, del *ensemble*, en las condiciones TD de interés.

Existen muchos algoritmos para la solución de las ecuaciones de movimiento, todos ellos asumen que las posiciones y las propiedades dinámicas (velocidad, aceleraciones, etc.) se pueden aproximar como expansión en serie de Taylor:

$$\vec{r}(t + \delta t) = \vec{r}(t) + \delta t \vec{v}(t) + \frac{1}{2} \delta t^2 \vec{a}(t) + \frac{1}{6} \delta t^3 \vec{b}(t) + \dots \quad (\text{Ec. 18})$$

$$\vec{v}(t + \delta t) = \vec{v}(t) + \delta t \vec{a}(t) + \frac{1}{2} \delta t^2 \vec{b}(t) + \dots \quad (\text{Ec. 19})$$

$$\vec{a}(t + \delta t) = \vec{a}(t) + \delta t \vec{b}(t) + \dots \quad (\text{Ec. 20})$$

donde $\vec{v}, \vec{a}, \vec{b}$ son los vectores velocidad en tres dimensiones (es decir, la primera derivada de la posición respecto del tiempo), aceleración (segunda derivada) y tercera derivada, respectivamente.

Es importante decidir qué algoritmo es el más apropiado, ya que determina el costo computacional requerido para la simulación. Los algoritmos más ampliamente utilizados en DM son los algoritmos Verlet y Verlet velocidad [8]. Este último es el algoritmo implementado en el programa utilizado para las simulaciones atómicas de este trabajo de tesis (*namd2*) [9], y consiste en calcular las posiciones usando una expansión de Taylor truncada de segundo orden

$$\vec{r}(t + \delta t) = \vec{r}(t) + \delta t \vec{v}(t) + \frac{1}{2} \delta t^2 \vec{a}(t) \quad (\text{Ec. 21})$$

La velocidad en el instante $t + \delta t$ se calcula promediando la aceleración en el instante $t + \delta t$

$$\vec{v}(t + \delta t) = \vec{v}(t) + \frac{\vec{a}(t) \delta t}{2} + \frac{\vec{a}(t + \delta t) \delta t}{2} \quad (\text{Ec. 22})$$

El algoritmo Verlet velocidad se implementa en tres etapas, porque es necesario almacenar los valores de aceleración en el instante $t + \delta t$ para el cálculo de las nuevas velocidades (Ec. 22). Así, en primer lugar, se calculan las posiciones mediante la ecuación 21. Las velocidades en el instante intermedio $t + \frac{1}{2} \delta t$ -utilizadas para calcular las posiciones en $t + \delta t$ - se determinan según

$$\vec{v}\left(t + \frac{1}{2} \delta t\right) = \vec{v}(t) + \frac{1}{2} \delta t \vec{a}(t) \quad (\text{Ec. 23})$$

Las nuevas fuerzas se calculan para las nuevas posiciones en el instante $t + \delta t$. A continuación, se calcula $\vec{a}(t)$. Por lo tanto, la ecuación 13 se puede resolver ya que

$$\vec{v}(t + \delta t) = \vec{v}\left(t + \frac{1}{2}\delta t\right) + \frac{1}{2}\delta t\vec{a}(t + \delta t) \quad (\text{Ec. 24})$$

La diferencia entre los distintos algoritmos de integración radica en la precisión del cálculo, a expensas del costo computacional. El algoritmo a utilizar debe garantizar la conservación de la energía y el impulso, ser computacionalmente eficiente y permitir el uso de un paso de tiempo prolongado. La razón para usar el algoritmo Verlet velocidad en simulaciones de DM, se debe a que evalúa las fuerzas sólo una vez por paso de tiempo, las velocidades se calculan con mayor precisión y se almacenan menos vectores, en comparación con el algoritmo Verlet.

Condiciones periódicas de contorno

Para realizar una simulación de DM, es necesario crear una "caja de simulación" conteniendo N moléculas, sujeta a las condiciones de contorno apropiadas a la geometría del sistema macroscópico. El número de partículas de la caja de simulación es muy pequeño, comparado con una muestra de laboratorio experimental. En esta situación, los efectos de borde –sobre las partículas en el contorno de la caja de simulación– son bastante significativos y generan interacciones diferentes a las que se dan en el seno del sistema. Para minimizar estos efectos, se trabaja bajo condiciones periódicas de contorno. La caja de simulación se rodea de copias idénticas en todas las direcciones (xyz), dando lugar a un sistema periódico que tiende al límite termodinámico. Cuando una partícula sale de la caja de simulación, su imagen entra simultáneamente por la cara opuesta (figura M.3).

Al comienzo de la simulación, además de asignar las posiciones y velocidades iniciales, hay que buscar un tratamiento adecuado para la interacción entre las imágenes de las partículas que pertenecen a diferentes réplicas periódicas. Si las fuerzas involucradas son de corto alcance, puede aplicarse un radio de corte esférico. Pero cuando la interacción entre las partículas decae lentamente con la distancia (interacciones electrostáticas), se puede aplicar una fuerza efectiva obte-

nida mediante la suma de las interacciones entre todas estas imágenes periódicas. Uno de los métodos bien establecidos para esto es la suma de Ewald (*PME*) [11].

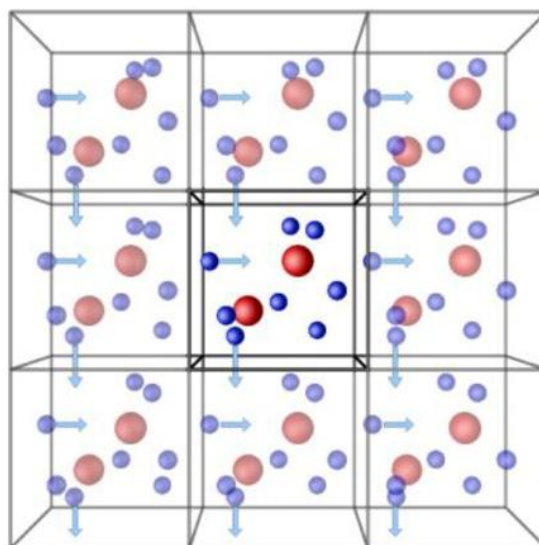


Figura M.3. Condiciones periódicas de contorno [10].

Simulaciones

Una vez conocidas las posiciones iniciales de las partículas del sistema, se arma la caja de simulación, utilizando programas como PACKMOL [12] o *VMD* [13]. La caja de simulación representa la configuración inicial o tiempo cero ($t=0$), cuya elección debe realizarse con cuidado dada su influencia en la calidad y estabilidad de la simulación. Por ejemplo, para un *ensemble* cuyo volumen es constante (canónico o microcanónico), las dimensiones se eligen respetando la densidad (N/V) del sistema en las condiciones termodinámicas deseadas. Cuando no se conoce la densidad experimental del sistema, un procedimiento habitual consiste en trabajar con un *ensemble* NPT [1], donde el volumen del sistema fluctúa mientras se mantienen constantes la presión y la temperatura.

En principio, se puede comenzar haciendo una minimización de energía de la estructura inicial, para eliminar superposiciones y contactos entre partículas generados durante el ensamblaje del sistema, que podrían distorsionar la estructura e inestabilizar la simulación.

Durante la fase de termalización, se asignan las velocidades iniciales a una dada temperatura y se

inicia la simulación. Las nuevas velocidades se asignan periódicamente, aumentando gradualmente la temperatura hasta llegar a la temperatura deseada. Durante la equilibración a la temperatura seleccionada, se controlan algunas propiedades del sistema (P, T y E), hasta su estabilización.

La fase final es la fase de producción, que se extiende durante el tiempo deseado, dependiendo del proceso de interés. Es la fase en la que se calculan los parámetros u observables TD del *ensemble*.

Termostatos y barostatos

La temperatura puede mantenerse constante durante una simulación (*ensembles* NVT y NPT). Una de las formas de hacerlo consiste en el escalado de velocidades. Las velocidades instantáneas de las partículas se multiplican por un factor a intervalos regulares

$$\alpha = \sqrt{\frac{T^{\text{deseada}}}{T(t)}} \quad (\text{Ec. 25})$$

para que la temperatura se mantenga constante y converja a un valor determinado. El termostato de Berendsen se basa en este procedimiento, y permite establecer un factor para escalar la temperatura instantánea y que se acerque al valor deseado. El termostato de Langevin implica considerar la fricción y colisión en sistemas soluto-solvente, causada por las partículas de solvente en el movimiento de las partículas de soluto [14]. Existen métodos más complejos en los cuales el sistema se acopla a un baño térmico (grados de libertad adicionales), con el cual intercambia calor.

La presión se mantiene constante de manera análoga a la temperatura, mediante su escalado

$$\gamma = \sqrt[3]{\frac{p(t)}{p^{\text{deseada}}}} \quad (\text{Ec. 26})$$

Otra alternativa es utilizar un pistón (grados de libertad adicionales) para regular el volumen. Al modificar el volumen de la caja de simulación, se alteran las distancias entre las partículas y consecuentemente también las interacciones entre ellas.

Niveles de descripción y campos de fuerza

En las simulaciones realizadas en esta tesis, utilizamos distintos niveles de descripción, en función de los sistemas y procesos a estudiar: escala atómica y grano grueso (*coarse grain*, *CG*). Independientemente de la escala de los modelos estudiados, la calidad de los resultados obtenidos en simulaciones clásicas de DM, depende sensiblemente de la precisión en la descripción de las interacciones. Habitualmente, el tratamiento de las interacciones en los sistemas simulados involucra la introducción de un campo de fuerzas efectivo, que permite realizar cálculos en gran escala de proteínas, membranas y sistemas biológicos relativamente grandes, de forma explícita. Entre los potenciales efectivos clásicos disponibles se destacan los campos de fuerza atómicos *OPLS* [15], *CHARMM* [16], *AMBER* [17], *GROMOS* [18] y *CG Martini* [19]. En ellos se describen los valores de equilibrio y las constantes de interacción de múltiples partículas.

1. SIMULACIONES ATOMÍSTICAS

En la primera parte de la tesis estudiamos, mediante simulaciones a escala atómica, el comportamiento de compuestos indólicos en membranas. En sistemas como las bicapas lipídicas, el carácter fluido de las membranas en condiciones fisiológicas y la falta de datos experimentales directamente interpretables en términos de posiciones y velocidades [20], otorga enorme poder a la herramienta de DM. Por ejemplo, se pueden estudiar con detalle atómico, procesos dinámicos como la difusión de fármacos a través de membranas lipídicas [21] en la escala de los nanosegundos [22, 23].

Mediante simulaciones podemos estudiar condiciones no alcanzables a nivel experimental, aportando información sustancial de los sistemas. Por ejemplo, el estudio de componentes en bajas concentraciones y sistemas aislados [24], habituales en DM, está limitado experimentalmente aún con diluciones extremas y debido a la sensibilidad de los equipos de detección [25]. La principal ventaja de la resolución atómica es el nivel de detalle logrado. Por

ejemplo, permite analizar explícitamente las interacciones entre moléculas de fármaco, fármaco-lípido y fármaco-solvente [26].

Elección de los sistemas

Las bicapas lipídicas modelo que utilizamos en las simulaciones están compuestas por 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (POPC). POPC presenta una cabeza polar de fosfatidilcolina (PC) y dos cadenas aciladas esterificando al glicerol: una cadena saturada de 16 átomos de carbono (palmitoil; 16:0) y una insaturada en posición 9 de 18 átomos de carbono (oleoil, 18:1(9Z)) (figura M.4). Dada su estructura, en fase acuosa POPC se organiza en bicapas lipídicas. Su temperatura de transición de fases es -2°C [27], por lo que a temperatura ambiente ($\sim 25^{\circ}\text{C}$) y fisiológica (37°C) se encuentra en estado fluido.

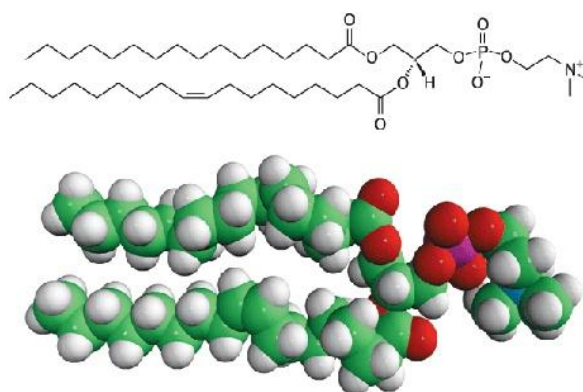


Figura M.4. Estructura atómica (arriba) y representación *VDW* (abajo) del fosfolípido zwitteriónico POPC [27].

Seleccionamos el lípido POPC por varios motivos, además de su comportamiento termodinámico. En primer lugar, por ser considerado como uno de los lípidos modelo para experimentos biofísicos y porque su composición en ácidos grasos imita la composición de fosfolípidos de membranas de mamíferos. En segundo lugar, por ser uno de los componentes predominantes de *EPC*, el lípido utilizado para las determinaciones experimentales (ver Introducción).

Descripción de los sistemas atomísticos

Todos los sistemas que simulamos con resolución atómica, consisten en una bicapa lipídica de 150 moléculas de POPC (75 en cada monocapa) completamente hidratada. La cantidad de agua

varía de 4.200 a 5000 moléculas, dependiendo de la presencia y concentración de compuestos interactuantes. Con el fin de asegurar la electroneutralidad, añadimos contraiones cloruro a los sistemas con moléculas protonadas. Todos los sistemas están sujetos a condiciones periódicas de contorno.

Detalle de las simulaciones

Realizamos las simulaciones atomísticas utilizando el programa *namd2* [9], con el campo de fuerzas *CHARMM* [16]. Este campo de fuerzas fue desarrollado a partir de datos experimentales y cálculos de química cuántica. Las moléculas de agua fueron explícitamente descritas por el modelo *TIP3P* [28]. Algunos compuestos ya estaban parametrizados en el campo de fuerza *CHARMM* (aminoácido Trp) [29]. Por lo tanto, los parámetros de los demás compuestos indólicos estudiados (5-HT, 5-HTP y triptanos, en sus diversas formas de ionización) se tomaron en su mayoría del modelo de Trp de *CHARMM*, debido a sus similitudes estructurales.

Las estructuras iniciales optimizadas de todos los compuestos indólicos estudiados se obtuvieron a partir de cálculos de química cuántica, utilizando el paquete *Gaussian03W* [6]. La optimización de geometría se realizó según la teoría del funcional de densidad [30], utilizando el funcional *B3LYP* [31] y el conjunto de bases 6-311G** [32]. A partir de estos cálculos obtuvimos los valores de longitud de enlaces y los ángulos de equilibrio de las estructuras de interés. Las cargas atómicas parciales se obtuvieron por un cálculo de un único punto HF/6-31G* [33] dentro del protocolo Merz-Singh-Kollman [34]. Todos los cálculos se realizaron utilizando el modelo continuo polarizable (*polarized continuum model, PCM*) [35], con constante dieléctrica de solvente de 80, correspondiente a agua líquida en condiciones ambientales. *PCM* fue la metodología elegida para obtener una adecuada separación y estabilidad de cargas en las formas zwitteriónicas de los aminoácidos y en las formas cargadas (protonadas).

Las simulaciones atomísticas clásicas de DM se realizaron en condiciones NPT. La temperatura se mantuvo constante a 310K, a través de un termostato de Langevin [9, 14]. El termostato se

utilizó sin acoplamiento a hidrógenos y con un coeficiente de amortiguación de 1/ps. Además, se mantuvo la presión a 1atm mediante el uso de un barostato de Langevin [14, 36], con un periodo de pistón de 5ps y un tiempo de amortiguación de 5ps.

Utilizamos el algoritmo de paso de tiempo múltiple, *RESPA* [37], con un paso de tiempo de 2fs. Este paso de tiempo permitió integrar adecuadamente la mayor parte de los movimientos atómicos (salvo las vibraciones de enlaces de alta frecuencia). Las fuerzas de corto alcance se calcularon utilizando un valor de corte de 10Å, y las de largo alcance por medio de la técnica *PME* [11]. Las estructuras iniciales se minimizaron energéticamente utilizando el algoritmo *Steepest Descent* para eliminar malos contactos [38].

CRITERIOS Y HERRAMIENTAS DE ANÁLISIS

A continuación, describimos algunas de las propiedades analizadas y/o herramientas utilizadas en el estudio del comportamiento de compuestos indólicos en membranas modelo, por simulaciones DM a escala atómica. Mencionamos algunas interacciones y también las propiedades de las bicapas lipídicas que pueden ser modificadas por la presencia de estos compuestos.

Interacción puente salino

El puente salino es un tipo de interacción electrostática no covalente entre pares cargados [39-42]. En las proteínas de membrana, esta interacción favorece la orientación de segmentos transmembrana, y suele involucrar residuos de Trp [43, 44]. Esta interacción puede ser analizada mediante la función de distribución radial ($g(r)$) entre los átomos N de un grupo amino cargado y P del grupo fosfato (POPC), que da la probabilidad de encontrar un átomo P a una distancia r del átomo N. La distancia mínima de contacto entre dichos átomos (hasta 6Å) y su variación, sirven para estimar la estabilidad de la interacción.

Interacción catión- π

Catión- π es un tipo de interacción no covalente entre un catión y un sistema rico en electrones π

(por ejemplo, benceno, etileno, etc.). La capacidad de establecer la interacción catión- π hace que fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr), y Trp no sean considerados simplemente aminoácidos "hidrofóbicos", diferenciándose de los residuos hidrofóbicos no aromáticos, como valina (Val), leucina (Leu), e isoleucina (Ile). La naturaleza dual del benceno, hidrofóbica y cuadrupolar, permite a los aminoácidos aromáticos desempeñar un papel único en la estructura y función de proteínas [45]. Los compuestos indólicos tienen carácter dador de catión- π . Podemos estudiar esta interacción mediante la función de distribución radial entre el centroide del anillo aromático (sistema de electrones π , dador) del compuesto indólico y el grupo colina cargado (catión, aceptor) de POPC. El criterio de distancia fue adoptado de Petersen *et al* [46] y se esquematiza en la figura M.5.

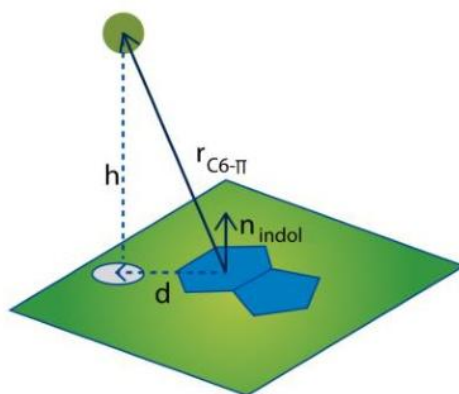


Figura M.5. Requisitos de distancia (d) para la interacción catión- π desde el centroide del anillo de seis miembros del indol. La normal al plano del anillo de indol rígido n , la distancia fuera del plano h y en el plano r , determinan la distancia angular $r_{C6-\pi}$ respecto del dador.

Enlaces de hidrógeno

La interacción por enlace de hidrógeno (*hydrogen bond*, HB), implica la atracción electrostática de un átomo de hidrógeno H unido a un átomo dador (X-H) por otro átomo aceptor (A) del H. Los átomos X y A en general, pero no siempre, son electronegativos [47]. Esta interacción tiene innumerables implicancias y funciones en química y biología, incluyendo la estabilidad de las hebras en el ADN [48]. Por ejemplo, en moléculas indólicas, el anillo aromático puede actuar como dador de HB a través del grupo amino. Hemos adoptado los siguientes criterios geométricos para el enlace de hidrógeno: la distancia entre el grupo aceptor y el hidrógeno del

grupo dador debe ser menor o igual a 2.0\AA , y el ángulo entre dador-aceptor debe ser menor que 30° .

Perfil de densidad

La distribución de los componentes de la bicapa lipídica se obtiene a partir del perfil de densidad (de masa o carga) [20]. El perfil de densidad electrónica (PDE), se calcula promediando en el tiempo y a lo largo del eje z (normal a la bicapa), la carga neta $Q(z)$ contenida en el volumen

$$\delta V(z); PDE(z) \propto \left\langle \frac{Q(z)}{\delta V(z)} \right\rangle_t \quad (\text{Ec. 27})$$

En el PDE de una bicapa se identifican cuatro regiones de distinta densidad, características de la organización de bicapas. En la zona central de escasa densidad, se interdigitan los metilos terminales. Sigue una zona de densidad constante (metilenos de las cadenas hidrocarbonadas), a continuación una región de alta densidad (cabezas polares) y luego una zona de densidad constante (fase acuosa).

Área por lípido

El área por lípido, A_{lip} , indica el empaquetamiento y fluidez de los lípidos formando bicapas [49]. A_{lip} se calcula multiplicando la longitud de la caja de simulación en la dimensión x por la dimensión y , dividido por el número de moléculas de lípido por monocapa. A nivel experimental, el valor de A_{lip} y el perfil de densidad se pueden obtener a partir de difracción de neutrones o rayos X [50].

Parámetro de orden

La organización de las colas hidrocarbonadas se estima calculando el parámetro de orden (PO):

$$S_{mol} = \frac{1}{2} \langle 3\cos^2\theta_n - 1 \rangle \quad (\text{Ec. 28})$$

siendo θ_n el ángulo entre la normal a la bicapa y la normal al plano definido por H-C-H, para los n carbonos de ambas cadenas aciladas (promediado en el tiempo) [51]. El PO está relacionado con el grado de movilidad y la isomerización *trans-gauche* de las cadenas [52]. Esta propiedad se mide en muestras de lípidos deuterados por ^2H -RMN [51].

Potencial de membrana

Las membranas lipídicas tienen un potencial electrostático (V) característico, debido a la distribución de dipolos en la bicapa [53]. El potencial se calcula a partir de las simulaciones mediante doble integración de la densidad de carga, promediada entre las dos monocapas y en el tiempo. Se puede medir el potencial dipolar con el uso de sondas fluorescentes [49].

2. SIMULACIONES A ESCALA GRANO GRUESO

En la segunda parte de la tesis realizamos simulaciones a escala grano grueso para estudiar el comportamiento de sumatriptan y compuestos poliméricos en distintos entornos. Utilizamos la misma metodología, simulaciones de dinámica molecular, pero describimos los sistemas en una resolución diferente, a escala grano grueso o *CG*. A través de la reducción de grados de libertad, los modelos *CG* son de gran utilidad para simular fenómenos colectivos, en la meso-escala [54], resolviendo las limitaciones de tamaño y escala temporal de las simulaciones atomísticas. Por ejemplo, por simulaciones *CG* se pueden estudiar procesos como el auto-ensamblaje de bicapas lipídicas [55], formación de liposomas [56] y micelas [57], interacción de numerosos compuestos con membranas [58] e incorporación de fármacos en sistemas poliméricos [59].

Como su nombre sugiere, la representación *CG* es menos detallada que la representación atomística. En los modelos *CG* se representan o “mapean” varios átomos simultáneamente en un único sitio específico. Los potenciales de interacción de los sitios *CG* deben ser modelados para reproducir adecuadamente propiedades físicas o estructurales de sistemas conocidos, determinadas experimentalmente o mediante simulaciones atomísticas.

Los modelos *CG* que utilizamos en nuestras simulaciones están basados en el campo de fuerzas Martini (*Martini Force Field, MFF*) [19, 60]. El modelo *CG* de Martini permite una representación sistemática de las moléculas mediante bloques, que interactúan a través de potenciales optimizados para su uso en una amplia gama de aplicaciones bio-moleculares [55, 58]. El campo de fuerzas *MFF* fue desarrollado sistemáticamente para la reproducción de la

energía libre de partición entre fases polares y apolares, para un gran número de compuestos químicos. En general, en *MFF* se mapean aproximadamente cuatro átomos pesados en un sitio de interacción. Sin embargo, para las estructuras rígidas que contienen anillos se utilizan procedimientos diferentes. Los tipos generales de partículas usadas son: polar (P), no polar (N), apolar (C), y cargada (Q) [19]. A su vez, cada tipo de particular presenta diferentes subtipos, según su capacidad como dador (d) o aceptor (a) de enlace de hidrógeno.

Descripción de los sistemas

Utilizando simulaciones *CG* investigamos la interacción de sumatriptan en bicapas de POPC; del co-polímero F127 en agua; y de F127 y otros co-polímeros con bicapas modelo.

Dentro de *MFF* muchos tipos de lípidos y moléculas de agua están totalmente parametrizados [19]. Las bicapas lipídicas hidratadas de POPC utilizadas en los siguientes capítulos se basaron en esta parametrización. Elegimos utilizar agua polarizable *CG* (*PW*), para considerar los efectos de orientación del solvente [61]. Sin embargo, en *MFF* no hay parámetros disponibles para sumatriptan y poloxámeros, por lo que tuvimos que adaptarlos de moléculas similares [60, 62, 63].

Detalle de las simulaciones

Realizamos todas las simulaciones *CG* con el programa *GROMACS* 4.5 [64]. Usamos un valor de corte de 12Å para las interacciones intermoleculares, Lennard-Jones y electrostáticas. Trabajamos en el *ensemble* NPT [36], bajo condiciones periódicas de contorno. La presión y temperatura se mantuvieron constantes ($P=1\text{bar}$ y $T=300\text{K}$) usando el termostato y barostato de Berendsen [65], con una constante de acoplamiento de 0.3ps para la temperatura y la presión, y compresibilidad de $3 \times 10^{-5} \text{bar}^{-1}$. Se utilizó un intervalo de tiempo de 10fs. En simulaciones *CG* se puede usar un paso de tiempo mayor (en comparación con simulaciones atomísticas, 2fs) para integrar adecuadamente las ecuaciones de movimiento, debido a que la superficie de energía del sistema es menos detallada (reducción de grados de libertad al mapear 4 átomos pesados en 1

sitio *CG*).

HERRAMIENTAS DE ANÁLISIS

Densidad radial

El cálculo del perfil de densidad descrito para las simulaciones atomísticas, puede extenderse al caso de objetos o cuerpos con simetría esférica, por ejemplo, vesículas y micelas. En el caso de las simulaciones *CG*, suele representarse el perfil de densidad de masa, dada la distribución de cargas en las partículas *CG*. La densidad radial se define como

$$PDR(r) \propto \left\langle \frac{M(r)}{\frac{4}{3}\pi((r+\delta)^3 - (r)^3)} \right\rangle_t \quad (\text{Ec. 29})$$

donde $M(r)$ es la suma de las masas de todas las partículas encontradas entre r y $r + \delta$, promediada en el tiempo [56]. Experimentalmente se mide por difracción de rayos X o neutrones.

Radio de giro y distancia extremo-extremo

El radio de giro (R_g) y la distancia extremo-extremo (Dee) de una cadena polimérica, son medidas habitualmente usadas para caracterizar el comportamiento dinámico de polímeros [66, 67]. R_g y Dee se utilizan como una estimación de las dimensiones, el tamaño, el grado de compactación y la forma dinámica de sistemas flexibles [67, 68]. R_g se calcula mediante la distancia cuadrática media de las partículas de una molécula desde su centro de masa:

$$R_g = \left(\frac{\sum_i \|r_i\|^2 m_i}{\sum_i m_i} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (\text{Ec. 30})$$

donde m_i es la masa y r_i la posición del átomo o partícula i respecto del centro de masa de la molécula. El radio de los polímeros se puede medir, a nivel experimental, por dispersión dinámica de luz [69, 70].

REFERENCIAS

1. Andersen, H.C., *Molecular dynamics simulations at constant pressure and/or temperature*. The Journal of chemical physics, 1980. 72(4): p. 2384-2393.
2. Karplus, M. and J.A. McCammon, *Molecular dynamics simulations of biomolecules*. Nature Structural & Molecular Biology, 2002. 9(9): p. 646-652.

3. Morgon, N.H. and K. Coutinho, *Métodos de química teórica e modelagem molecular*. 2007: Editora Livraria da Física.
4. *Molecular Modelling: Principles And Applications*, 2/E. 2009: Pearson Education.
5. wikipedia.
6. Frisch, M., G. Trucks, and H. Schlegel, (2003) Gaussian03, Revision B, 2003. 5.
7. PDB. *Protein Data Bank*, <http://www.wwpdb.org/>.
8. Van Gunsteren, W. and H. Berendsen, *Algorithms for macromolecular dynamics and constraint dynamics*. *Molecular Physics*, 1977. **34**(5): p. 1311-1327.
9. Kalé, L., et al., *NAMD2: Greater Scalability for Parallel Molecular Dynamics*. *Journal of Computational Physics*, 1999. **151**(1): p. 283-312.
10. isaacs.sourceforge.net/phys/pbc.
11. Essmann, U., et al., *A smooth particle mesh Ewald method*. *The Journal of Chemical Physics*, 1995. **103**(19): p. 8577-8593.
12. Martinez, L., et al., *PACKMOL: A package for building initial configurations for molecular dynamics simulations*. *Journal of Computational Chemistry*, 2009. **30**(13): p. 2157-2164.
13. Humphrey, W., A. Dalke, and K. Schulten, *VMD: Visual molecular dynamics*. *Journal of Molecular Graphics*, 1996. **14**(1): p. 33-38.
14. Feller, S.E., et al., *Constant pressure molecular dynamics simulation: The Langevin piston method*. *The Journal of Chemical Physics*, 1995. **103**(11): p. 4613-4621.
15. Jorgensen, W.L., D.S. Maxwell, and J. Tirado-Rives, *Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids*. *Journal of the American Chemical Society*, 1996. **118**(45): p. 11225-11236.
16. Feller, S.E. and A.D. MacKerell, *An Improved Empirical Potential Energy Function for Molecular Simulations of Phospholipids*. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2000. **104**(31): p. 7510-7515.
17. Wang, J., et al., *Development and testing of a general amber force field*. *Journal of computational chemistry*, 2004. **25**(9): p. 1157-1174.
18. van Gunsteren, W.F., X. Daura, and A.E. Mark, *GROMOS force field*. *Encyclopedia of computational chemistry*, 1998.
19. Marrink, S.J., et al., *The MARTINI Force Field: Coarse Grained Model for Biomolecular Simulations*. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2007. **111**(27): p. 7812-7824.
20. Tieleman, D. and H. Berendsen, *Molecular dynamics simulations of a fully hydrated dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer with different macroscopic boundary conditions and parameters*. *The Journal of chemical physics*, 1996. **105**(11): p. 4871-4880.
21. Wohrlert, J. and O. Edholm, *Dynamics in atomistic simulations of phospholipid membranes: Nuclear magnetic resonance relaxation rates and lateral diffusion*. *The Journal of Chemical Physics*, 2006. **125**(20): p. 204703.
22. Bemporad, D., C. Luttmann, and J.W. Essex, *Computer Simulation of Small Molecule Permeation across a Lipid Bilayer: Dependence on Bilayer Properties and Solute Volume, Size, and Cross-Sectional Area*. *Biophysical Journal*. **87**(1): p. 1-13.
23. Pickholz, M., L.F. Fraceto, and E. De Paula, *Distribution of neutral prilocaine in a phospholipid bilayer: Insights from molecular dynamics simulations*. *International Journal of Quantum Chemistry*, 2008. **108**(13): p. 2386-2391.
24. Karplus, M. and J. Kuriyan, *Molecular dynamics and protein function*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005. **102**(19): p. 6679-6685.
25. Bassolino-Klimas, D., H.E. Alper, and T.R. Stouch, *Solute diffusion in lipid bilayer membranes: an atomic level study by molecular dynamics simulation*. *Biochemistry*, 1993. **32**(47): p. 12624-12637.
26. Bemporad, D., C. Luttmann, and J.W. Essex, *Behaviour of small solutes and large drugs in a lipid bilayer from computer simulations*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 2005. **1718**(1-2): p. 1-21.
27. lipids, a., <http://www.avantilipids.com/>.
28. Jorgensen, W.L., et al., *Comparison of simple potential functions for simulating liquid water*. *The Journal of Chemical Physics*, 1983. **79**(2): p. 926-935.
29. MacKerell Jr, A.D., et al., *All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins*. *Journal of Physical Chemistry B*, 1998. **102**(18): p. 3586-3616.
30. Parr, R.G. and W. Yang, *Density Functional Theory of Atoms and Molecules*, 1989.
31. Becke, A.D., *Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange*. *The Journal of Chemical Physics*, 1993. **98**(7): p. 5648-5652.
32. McLean, A.D. and G.S. Chandler, *Contracted Gaussian basis sets for molecular calculations. I. Second row atoms, Z=11-18*. *The Journal of Chemical Physics*, 1980. **72**(10): p. 5639-5648.
33. Hehre, W.J., K. Ditchfield, and J.A. Pople, *Self-consistent molecular orbital methods. XII. Further extensions of gaussian-type basis sets for use in molecular orbital studies of organic molecules*. *The*

- Journal of Chemical Physics, 1972. **56**(5): p. 2257-2261.
34. Singh, U.C. and P.A. Kollman, *An approach to computing electrostatic charges for molecules*. Journal of Computational Chemistry, 1984. **5**(2): p. 129-145.
35. Kim, K. and K.D. Jordan, *Comparison of Density Functional and MP2 Calculations on the Water Monomer and Dimer*. The Journal of Physical Chemistry, 1994. **98**(40): p. 10089-10094.
36. Martyna, G.J., D.J. Tobias, and M.L. Klein, *Constant pressure molecular dynamics algorithms*. The Journal of Chemical Physics, 1994. **101**(5): p. 4177-4189.
37. Tuckerman, M.E., B.J. Berne, and G.J. Martyna, *Molecular dynamics algorithm for multiple time scales: Systems with long range forces*. The Journal of Chemical Physics, 1991. **94**(10): p. 6811-6815.
38. Chen, C., et al., *Efficiently finding the minimum free energy path from steepest descent path*. The Journal of Chemical Physics, 2013. **138**(16): p. 164122.
39. Barlow, D.J. and J.M. Thornton, *Ion-pairs in proteins*. Journal of Molecular Biology, 1983. **168**(4): p. 867-885.
40. Kumar, S. and R. Nussinov, *Salt bridge stability in monomeric proteins1*. Journal of Molecular Biology, 1999. **293**(5): p. 1241-1255.
41. Kumar, S. and R. Nussinov, *Relationship between ion pair geometries and electrostatic strengths in proteins*. Biophysical Journal, 2002. **83**(3): p. 1595-1612.
42. Aliste, M.P., J.L. MacCallum, and D.P. Tieleman, *Molecular Dynamics Simulations of Pentapeptides at Interfaces: Salt Bridge and Cation- π Interactions*. Biochemistry, 2003. **42**(30): p. 8976-8987.
43. Lensink, M.F., C. Govaerts, and J.M. Ruysschaert, *Identification of specific lipid-binding sites in integral membrane proteins*. Journal of Biological Chemistry, 2010. **285**(14): p. 10519-10526.
44. Dunkin, C.M., et al., *Molecular dynamics studies of transportan 10 (Tp10) interacting with a POPC lipid bilayer*. Journal of Physical Chemistry B, 2011. **115**(5): p. 1188-1198.
45. Ma, J.C. and D.A. Dougherty, *The Cation- π Interaction*. Chemical Reviews, 1997. **97**(5): p. 1303-1324.
46. Petersen, F.N.R., M.Ø. Jensen, and C.H. Nielsen, *Interfacial tryptophan residues: A role for the cation- π effect?* Biophysical Journal, 2005. **89**(6): p. 3985-3996.
47. Desiraju, G.R. and T. Steiner, *The Weak Hydrogen Bond: In Structural Chemistry and Biology*. 2001: Oxford University Press.
48. Watson, J.D. and F.H. Crick, *Molecular structure of nucleic acids*. Nature, 1953. **171**(4356): p. 737-738.
49. Clarke, R.J., *Effect of lipid structure on the dipole potential of phosphatidylcholine bilayers*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 1997. **1327**(2): p. 269-278.
50. Kučerka, N., et al., *Structure of fully hydrated fluid phase DMPC and DLPC lipid bilayers using x-ray scattering from oriented multilamellar arrays and from unilamellar vesicles*. Biophysical Journal, 2005. **88**(4): p. 2626-2637.
51. Vermeer, L., et al., *Acyl chain order parameter profiles in phospholipid bilayers: computation from molecular dynamics simulations and comparison with 2H NMR experiments*. European Biophysics Journal, 2007. **36**(8): p. 919-931.
52. Suits, F., M.C. Pitman, and S.E. Feller, *Molecular dynamics investigation of the structural properties of phosphatidylethanolamine lipid bilayers*. The Journal of Chemical Physics, 2005. **122**(24): p. 2447-14.
53. Florencia Martini, M., E.A. Disalvo, and M. Pickholz, *Nicotinamide and picolinamide in phospholipid monolayers*. International Journal of Quantum Chemistry, 2012. **112**(20): p. 3289-3295.
54. Saunders, M.G. and G.A. Voth, *Coarse-graining methods for computational biology*. Annual review of biophysics, 2013. **42**: p. 73-93.
55. Marrink, S.J., A.H. De Vries, and A.E. Mark, *Coarse grained model for semiquantitative lipid simulations*. The Journal of Physical Chemistry B, 2004. **108**(2): p. 750-760.
56. Pickholz, M. and G. Giupponi, *Coarse grained simulations of local anesthetics encapsulated into a liposome*. The Journal of Physical Chemistry B, 2010. **114**(20): p. 7009-7015.
57. Nielsen, S.O., et al., *Coarse grain models and the computer simulation of soft materials*. Journal of Physics: Condensed Matter, 2004. **16**(15): p. R481.
58. Jämbeck, J.P., et al., *Molecular Dynamics Studies of Liposomes as Carriers for Photosensitizing Drugs: Development, Validation, and Simulations with a Coarse-Grained Model*. Journal of Chemical Theory and Computation, 2014. **10**(1): p. 5-13.
59. Srinivas, G., D.E. Discher, and M.L. Klein, *Self-assembly and properties of diblock copolymers by coarse-grain molecular dynamics*. Nature materials, 2004. **3**(9): p. 638-644.
60. Monticelli, L., et al., *The MARTINI Coarse-Grained Force Field: Extension to Proteins*. Journal of Chemical Theory and Computation, 2008. **4**(5): p. 819-834.
61. Yesylevskyy, S.O., et al., *Polarizable water model for the coarse-grained MARTINI force field*. PLoS Comput Biol, 2010. **6**(6): p. e1000810.
62. Lee, H., et al., *A coarse-grained model for polyethylene oxide and polyethylene glycol: conformation and hydrodynamics*. The journal of physical chemistry B, 2009. **113**(40): p. 13186-13194.
63. de Jong, D.H., et al., *Improved Parameters for the Martini Coarse-Grained Protein Force Field*. Journal of

- Chemical Theory and Computation, 2013. **9**(1): p. 687-697.
64. Berendsen, H.J., D. van der Spoel, and R. van Drunen, *GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation*. *Computer Physics Communications*, 1995. **91**(1): p. 43-56.
65. Berendsen, H.J., et al., *Molecular dynamics with coupling to an external bath*. *The Journal of chemical physics*, 1984. **81**(8): p. 3684-3690.
66. Yamakawa, H., *Modern theory of polymer solutions*. 1971: Harper & Row.
67. Teraoka, I., *Polymer solutions: An introduction to physical properties* 2002. Wiley-Interscience.
68. Fixman, M., *Radius of gyration of polymer chains*. *The Journal of Chemical Physics*, 1962. **36**(2): p. 306-310.
69. Almgren, M., W. Brown, and S. Hvidt, *Self-aggregation and phase behavior of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) block copolymers in aqueous solution*. *Colloid and Polymer Science*, 1995. **273**(1): p. 2-15.
70. Linegar, K.L., et al., *Hydrodynamic radius of polyethylene glycol in solution obtained by dynamic light scattering*. *Colloid journal*, 2010. **72**(2): p. 279-281.

CAPITULO 1: INTERACCIÓN DE COMPUESTOS ENDÓGENOS

CON MEMBRANAS MODELO

MOTIVACIÓN

La serotonina es sintetizada fisiológicamente mediante una reacción en dos etapas a partir del aminoácido esencial triptófano, el cual es incorporado al organismo mediante la ingesta de alimentos. En la primera etapa limitante, el L-triptófano (Trp) es hidroxilado en el anillo aromático a 5-hidroxitriptófano (5-HTP), por la enzima triptófano hidroxilasa (TH). En una segunda etapa, la enzima L-aminoácido aromático decarboxilasa (L-AADC) convierte a 5-HTP en 5-HT [1] (figura 1.1).

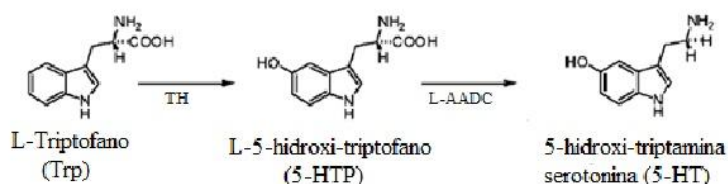


Figura 1.1. Síntesis de serotonina (adaptado de [2]).

Durante varios años, el aminoácido 5-HTP fue propuesto ampliamente para el tratamiento de la migraña y otros síndromes que afectan el sistema serotoninérgico [3, 4]. Este precursor de serotonina, extraído de las semillas de *Griffonia simplicifolia* [3], puede ser administrado por vía oral para mejorar la transmisión serotoninérgica o revertir diferentes síntomas. La administración de 5-HTP representa una elección más eficaz, frente a la de Trp, porque saltea la primera etapa limitante de la biosíntesis de 5-HT y es convertido por completo a 5-HT [5]. Sin embargo, el uso clínico de 5-HTP está en discusión, debido a sus contraindicaciones y efectos secundarios.

Para acceder al sistema central, Trp y 5-HT atraviesan la BHE a través de transportadores específicos (ver Introducción). En cambio, el mecanismo de pasaje del intermediario 5-HTP a través de la BHE, no está completamente dilucidado. En nuestro conocimiento, no hay datos experimentales indicando que 5-HTP cruza la BHE mediante un transportador específico. Algunos autores [5] sugieren que tendría la capacidad de difundir pasivamente (sin utilizar una

molécula transportadora). En relación con su capacidad de pasaje a través de BHE, se demostró que la administración intravenosa de 5-HTP aumenta los niveles de 5-HT en el líquido extracelular cerebral, primero, y luego en circulación [6]. Esto indica que 5-HT podría cruzar del SNC a la circulación a través de la BHE (a través de *SERT*), y que 5-HTP podría cruzar desde la circulación hacia el SNC a través de algún mecanismo desconocido. Por otro lado, otros autores proponen que 5-HTP utiliza el mismo transportador que los aminoácidos aromáticos triptófano y tirosina (tyr) [7]. De esta manera, la dupla Trp/5-HTP se comportaría como el sistema análogo: tyr/L-dopa. Cabe destacar que en la tríada tirosina, L-dopa y dopamina (figura 1.2), el neurotransmisor dopamina no posee un transportador específico, a diferencia de serotonina [8]. La dopamina necesaria en el SNC se forma localmente a partir de L-Dopa. Tirosina y L-dopa atraviesan la BHE a través del transportador de aminoácidos neutros [7-9].

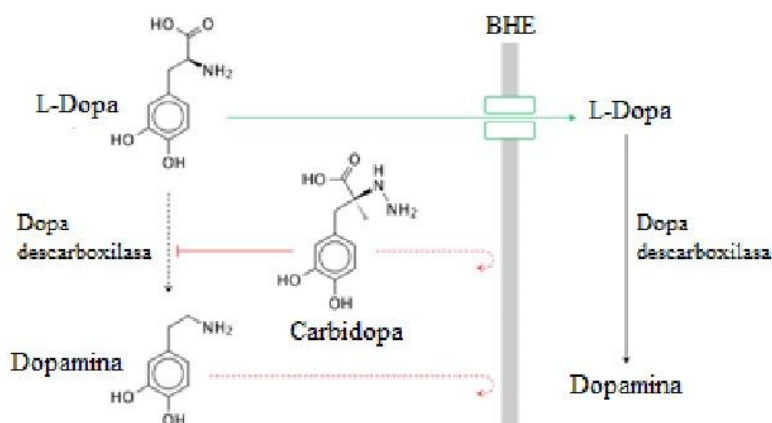


Figura 1.2. Esquema de pasaje de L-Dopa a través de BHE mediante el mismo transportador que su precursor, el aminoácido Tyr.

Rol del triptófano

A pesar de su baja incidencia en la naturaleza [10], el aminoácido Trp ha sido y es estudiado extensamente. Los residuos de Trp en las proteínas de membrana están involucrados en varias funciones, incluyendo la organización de proteínas, su anclaje y orientación dentro de la bicapa. Además, es común encontrar Trp en la interfase bicapa-agua en proteínas de membrana [11, 12]. Esto se correlaciona con la baja energía libre interfacial de Trp en la escala de Wimley-White [13].

Comparando con otros análogos de aminoácidos estudiados por simulación [14, 15], moléculas tales como el indol, muestran preferencia interfacial debido a una combinación de factores electrostáticos y la naturaleza del anillo indólico. Además, Johansson *et al* [16], estudiaron la solvatación de varios aminoácidos en segmentos transmembrana de proteínas de membrana, mostrando que Trp, al igual que Tyr, actúa como ancla de hélices transmembrana. Otros estudios fisicoquímicos de análogos de Trp, y pequeños péptidos que contienen Trp, sugieren que este comportamiento se debe a la gran estabilidad conferida por distintas interacciones interfaciales, tales como enlaces de hidrógeno, interacciones dipolares y catión- π [17]. Además de los mencionados, hay varios trabajos en la literatura que abordan la interacción de moléculas indólicas con bicapas lipídicas a través de simulaciones de DM [14, 18]. En la introducción y la metodología se mencionó el poder de la técnica de simulaciones de DM para el estudio de la interacción entre distintos compuestos con membranas.

SIMULACIONES

Estudiamos, mediante simulaciones de DM, la interacción de serotonina, 5-HTP y Trp (moléculas indólicas) con membranas modelo de POPC. Centramos nuestra atención en la localización, orientación e interacciones específicas de las moléculas indólicas dentro de la bicapa. Siendo moléculas muy similares, con diferentes propiedades fisiológicas, nuestro objetivo es comprender las principales similitudes y diferencias entre ellas en su interacción con membranas modelo.

Estos compuestos indólicos son sistemas de gran utilidad para estudiar compuestos implicados en la fisiopatología de la migraña e incluso han sido propuestos como agentes terapéuticos (5-HTP). Además, guardan similitud estructural con los triptanos, por lo que son sumamente útiles como moléculas de prueba para la comprensión de los sistemas en los capítulos siguientes.

Las cuatro moléculas estudiadas comparten el esqueleto indólico sustituido en la posición 3 (figura 1.3). Entre ellas, Trp y 5-HTP son aminoácidos: tienen un grupo carboxilato en el

sustituyente 2-aminoetilo, además del grupo NH_3^+ , por lo que, a pH fisiológico, los aminoácidos se encuentran en forma zwitteriónica y la serotonina en forma protonada [19]. Sin embargo, consideramos ambos estados de ionización para 5-HT: protonado (p5-HT) y neutro (n5-HT) (tienen un grupo NH_3^+ o NH_2 , respectivamente). Trp es la única de las cuatro moléculas que no tiene un grupo sustituyente OH en la posición 5 del indol. Los cuatro sistemas simulados contienen 2 moléculas idénticas (tabla 1.1).

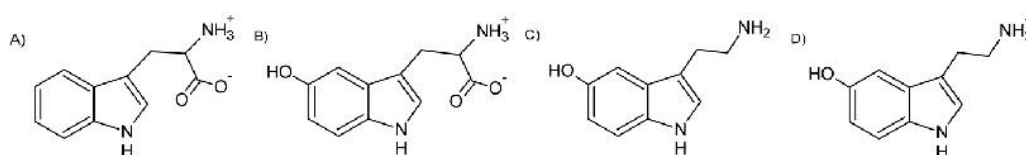


Figura 1.3. Estructuras de los compuestos indólicos estudiados: A) Trp, B) 5-HTP, C) serotonina neutra (n5-HT), y D) serotonina protonada (p5-HT).

Tabla 1.1. Sistemas simulados: compuestos endógenos en membranas modelo

Sistema	Moléculas indólicas	Cl^-	POPC	Agua	Moléculas indólicas/POPC	Condición inicial
Trp	2	—	150	4200	1:75	fase acuosa
5-HTP	2	—	150	4200	1:75	fase acuosa
p5-HT	2	2	150	4200	1:75	fase acuosa
n5HT	2	—	150	4200	1:75	fase acuosa

Las configuraciones iniciales de los sistemas fueron construidas utilizando el paquete Packmol [20]. Las moléculas indólicas se colocaron originalmente en la fase acuosa (figura 1.4).

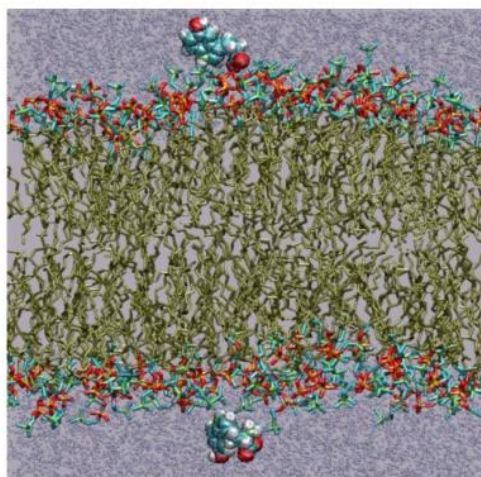


Figura 1.4. Representación de las condiciones iniciales para 5-HTP en la región acuosa circundante a una bicapa lipídica de POPC (tras período de equilibración). El agua se muestra en *CPK* (color azul claro), los lípidos en *licorice* (color ocre para las cadenas aciladas, verde y celeste para el grupo colina, rojo y naranja para el grupo fosfato) y 5-HTP en *VDW* (blanco para átomos de hidrógeno, celeste para carbono, rojo para oxígeno y azul para nitrógeno). Instantánea creada con *VMD* [21].

Cada simulación constó de un período de equilibración de aproximadamente 10ns, donde cada una de las moléculas de interés migró a su localización preferencial en la membrana, seguido de 50ns de producción.

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Con el fin de tener una idea de la organización general de los sistemas en estudio y de la localización de las moléculas indólicas en la bicapa, calculamos el perfil de densidad electrónica (PDE) en función del eje z (normal a la bicapa). El valor $z=0\text{\AA}$ corresponde al centro de la bicapa. En la figura 1.5, mostramos los PDE de los cuatro sistemas: a) Trp, b) 5-HTP, c) n5-HT y d) p5-HT. El PDE correspondiente a POPC se muestra en negro, el del agua en azul y el de las moléculas indólicas en rojo (escalados para facilitar su visualización). Como podemos ver en todos los casos de la figura 1.5, aparecen tres regiones bien definidas: una fase acuosa (*bulk*, no asociada a lípidos), una fase compleja -la interfase bicapa-agua, donde los grupos de cabeza polar están hidratados - y una región hidrofóbica, escasamente hidratada. El PDE de POPC reveló la distribución característica de la organización de una bicapa lipídica. Al superponer la distribución de POPC para los cuatro casos estudiados, comprobamos que la organización de la bicapa no se vio afectada significativamente por la presencia de las moléculas indólicas.

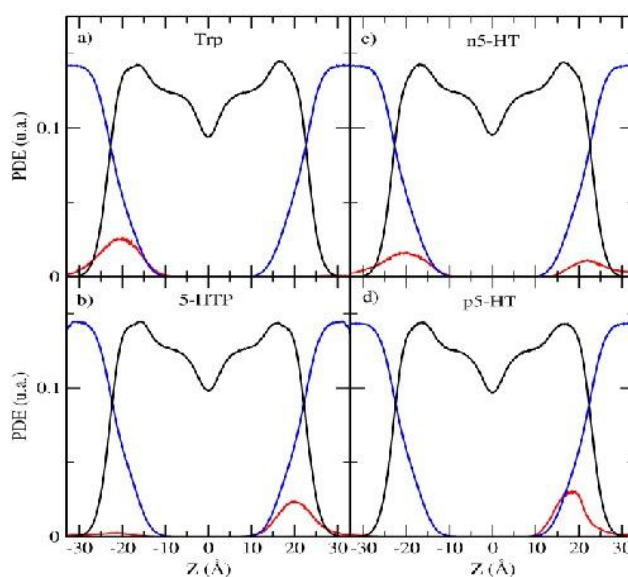


Figura 1.5. Perfil de densidad electrónica para los sistemas estudiados: a) Trp; b) 5-HTP; c) n5-HT; d) p5-HT. La densidad de POPC se muestra en negro, del agua en azul y de las moléculas indólicas en rojo (ampliada quince veces para mejor visualización). $z=0\text{\AA}$ corresponde al centro de la bicapa.

El espesor de la bicapa podría estimarse a partir de la distancia entre los máximos de la distribución de POPC (correspondiente esencialmente a la distancia fósforo-fósforo). La presencia de las moléculas no alteró el espesor de la bicapa. Además, todas las moléculas indólicas se encontraron esencialmente en la interfase bicapa-agua, con acceso a la fase acuosa. En algunos casos, este acceso condujo a que ambas moléculas se encontraran en la misma monocapa, explicando las distribuciones asimétricas observadas. Particularmente, la molécula de 5-HTP mostró mayor acceso a la fase acuosa que las demás, probablemente debido a la presencia de un mayor número de grupos polares en su estructura. Por otro lado, p5-HT, incluso teniendo una carga neta, mostró una distribución más compacta que las otras moléculas en la interfase. La presencia de carga neta pudo conducir a un mayor grado de anclaje en la región de la interfase, donde se localizan los grupos de cabeza polar cargados. En el próximo capítulo discutiremos el comportamiento de moléculas cargadas (estructuralmente similares a serotonina) en la interfase bicapa-agua.

Para entender detalladamente la localización interfacial de las moléculas estudiadas, investigamos la orientación de distintos grupos de estas moléculas por separado. Luego, analizamos las principales interacciones específicas de las moléculas indólicas respecto de POPC y el agua. De esta manera, como primer paso, realizamos un PDE detallado de los diferentes grupos de las moléculas (figura 1.6 A) a D)). Los grupos seleccionados fueron el hidroxilo (OH) lateral (violeta), el amino lateral (negro) y los anillos de benceno (rojo) y pirrol (verde). Todos los grupos fueron escalados para una mejor visualización. Con el objeto de facilitar la comparación, incluimos el PDE total para cada molécula (turquesa) y para los fosfatos de POPC (negro punteado). Dentro de la figura 1.6 A), B) y D), mostramos un esquema representativo de la orientación preferencial de las tres moléculas correspondientes. Particularmente para p5-HT, se observó superposición de la densidad del grupo amino lateral cargado (negro) con la densidad de fosfato de POPC (negro punteado). Como ya se comentó, la presencia de carga neta en p5-HT pudo ser responsable por su localización y su distribución compacta. Sin embargo, para n5-HT

(figura 1.6.C) el valor máximo de distribución de los diferentes grupos analizados se encontró en la misma posición en el eje z, indicando que esta molécula no adoptó una orientación preferencial (en media). Además, el valor de área por lípido de la bicapa aumentó ligeramente en presencia de n5-HT (61.5\AA^2) respecto a las otras moléculas ($\sim 60\text{\AA}^2$). El área por lípido de una bicapa modelo pura de POPC, en condiciones similares a la simulación, fue reportada en la literatura como 58\AA^2 [22]. El mayor efecto de n5-HT sobre esta propiedad se puede explicar por la ausencia de carga, dando lugar a una menor restricción rotacional y, consecuentemente, un mayor volumen efectivo, en comparación con las otras moléculas.

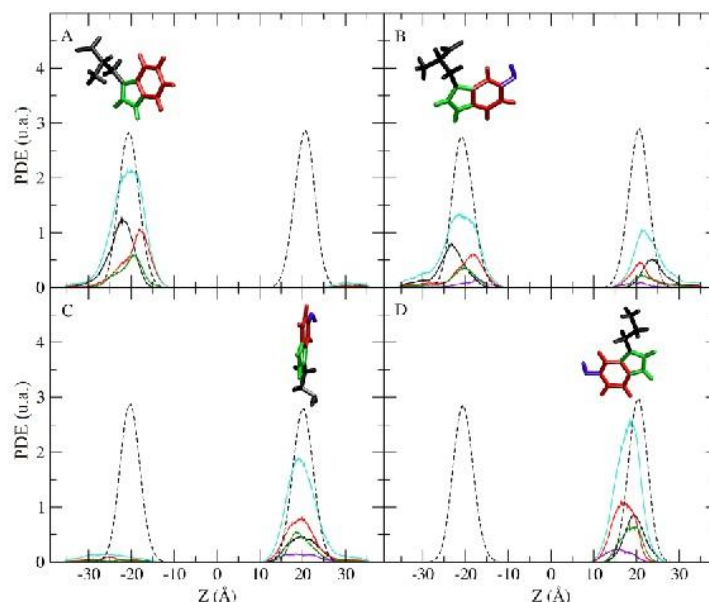


Figura 1.6. Perfil de densidad electrónica detallado de: A) Trp; B) 5-HTP; C) n5-HT (orientación arbitraria); D) p5-HT. La densidad total de las moléculas indólicas se muestra en celeste, amino lateral en negro, benceno en rojo, pirrol en verde, hidroxilo en violeta (ampliado 10000 veces para mejor visualización) y fosfato de POPC en líneas punteadas negras. $z=0\text{\AA}$ corresponde al centro de la bicapa.

Tal como discutimos en el párrafo anterior, para Trp, 5-HTP y p5-HT observamos que el grupo amino lateral adoptó una localización más externa en la interfase bicapa-agua. También pudo adjudicarse a una interacción específica con otro grupo cargado, por ejemplo, la formación de un puente salino con el grupo fosfato de POPC. En este caso, investigamos la formación de puente salino entre el centro de masa del grupo amino lateral (moléculas indólicas) y el centro de masa del grupo fosfato (POPC), mediante el análisis de la función de distribución radial. En la figura 1.7 mostramos el $g(r)$ para los tres casos estudiados. A partir de este análisis, encontramos que

las moléculas zwitteriónicas y la serotonina cargada formaron puente salino, como se evidencia por el primer pico a $\sim 4\text{\AA}$. Sin embargo, la intensidad de esta interacción fue mayor para la molécula protonada (p5-HT), tal como se esperaba. Además, con el fin de ver la estabilidad de la interacción para cada caso, calculamos la distancia mínima entre los grupos amino lateral de p5-HT, Trp y 5-HTP, y el grupo fosfato de POPC, en función del tiempo. Mostramos los resultados en el inserto en la figura 1.7. Observamos que la estabilidad de esta interacción también fue mayor para p5-HT, dada la menor dispersión de la distancia mínima.

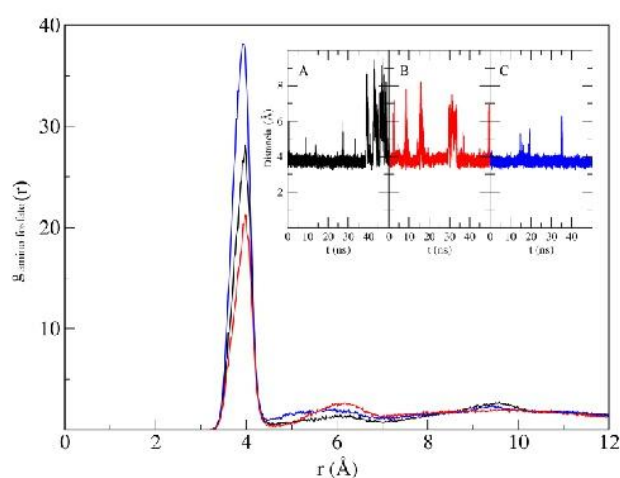


Figura 1.7. Función de distribución radial para los sistemas Trp, 5-HTP y p5-HT. El par de átomos considerado es el grupo amino lateral (moléculas indólicas) y el grupo fosfato (POPC). Trp se muestra en negro, 5-HTP en rojo y p5-HT en azul. Recuadro interno: distancia mínima entre el par considerado en el tiempo, A) Trp; B) 5-HTP; C) p5-HT.

El anillo indólico es un sistema aromático rico en electrones [23, 24], tiene carácter dador de enlace de hidrógeno, debido al grupo NH, y capacidad para formar interacciones catión- π . Trp y sus compuestos aromáticos relacionados -5-HTP y 5-HT- pueden actuar como dadores de electrones π con el grupo amino de la colina de POPC, cargado positivamente. Estudiamos este tipo de interacción a partir de la función de distribución radial entre el centroide del anillo de benceno (indol, moléculas indólicas) y el átomo nitrógeno cargado (N) de la colina (POPC) (figura 1.8), de manera similar a Petersen *et al* [17]. La función $g_{C-\pi}(r)$ calculada para los cuatro casos se muestra en la parte izquierda de la figura 1.8. Observamos un pico bien definido a $\sim 4.0\text{\AA}$ para todas las moléculas, sugiriendo que los pares considerados establecieron interacción catión- π . En particular, n5-HT mostró la mayor intensidad para esta interacción, debido a que el

grupo benceno se encontró más superficialmente en la interfase bicapa-agua (figura 1.6.C), y por lo tanto más próximo al grupo colina.

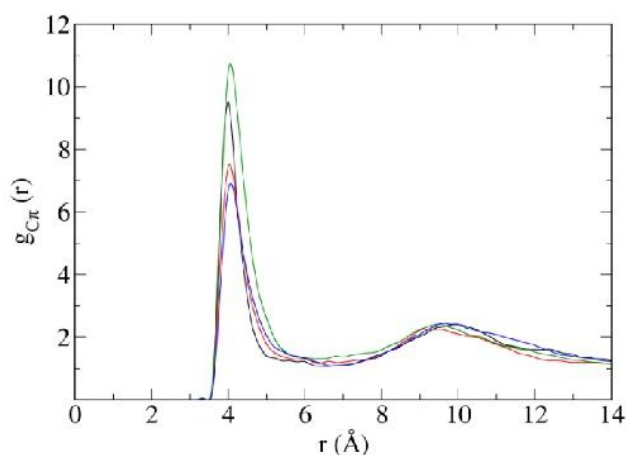


Figura 1.8. Función de distribución radial para todos los sistemas. El par de átomos considerado es el centroide del anillo de benceno del indol (molécula indólica) y el átomo N del grupo colina (POPC). Trp se muestra en negro, 5-HTP en rojo, n5-HT en verde y p5-HT en azul.

En el PDE detallado (figura 1.6) observamos que el anillo aromático de Trp (A), 5-HTP (B) y p5-HT (D) accedió a una región más profunda en la bicapa que el grupo amino de la cadena lateral. Además, vimos una superposición considerable entre las densidades del anillo pirrol y el grupo fosfato de POPC, para todas las moléculas indólicas. Con el fin de dilucidar si esta superposición correspondía a una interacción específica, calculamos la función de distribución radial entre el átomo de hidrógeno del NH indólico y los átomos de oxígeno del grupo fosfato de POPC, para los cuatro sistemas. Los resultados se muestran en la figura 1.9.

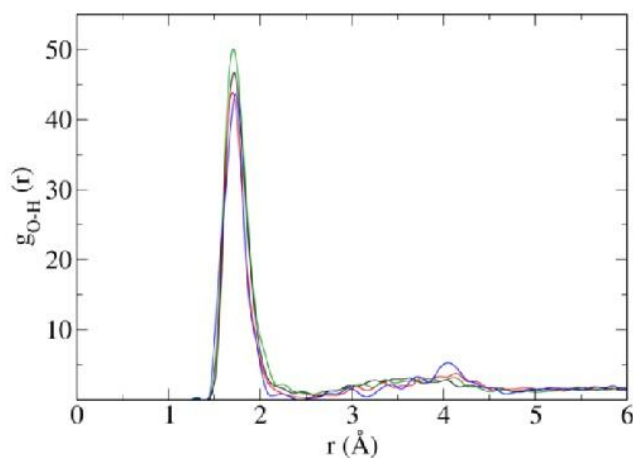


Figura 1.9. Función de distribución radial para todos los sistemas. El par considerado es Op (átomos de oxígeno, fosfato, POPC) e H (átomo de hidrógeno, NH indol, molécula indólica). Trp en negro, 5-HTP en rojo, n5-HT en verde y p5-HT en azul.

Observamos un pico definido a $\sim 1,7\text{\AA}$ en todos los casos. Esta distancia es característica de una interacción tipo enlace de hidrógeno. Analizamos la formación de enlaces de hidrógeno entre este y otros pares de dadores y aceptores.

El número de HB formados por cada par seleccionado se determinó contando el número de pares que satisfacen estos criterios geométricos promediados en el tiempo (50ns). POPC actúa como aceptor a través de los átomos de oxígeno que están unidos a un único átomo, en los grupos fosfato (Op) y carbonilo (Oc), por lo tanto calculamos el número de HB entre ellos y tres grupos dadores de las moléculas estudiadas (amino lateral, NH indol y OH lateral). En la tabla 1.2, resumimos el número promedio de HB entre estos grupos.

Tabla 1.2. Número de enlaces de hidrógeno con POPC

Sistema	Grupo	Op	Oc
Trp	NH ₃ ⁺ lateral	1.118(4)	0.107(2)
	NH indol	0.354(2)	0.077(2)
5-HTP	NH ₃ ⁺ lateral	0.803(3)	0.023(1)
	NH indol	0.352(2)	0.006(1)
	OH	0.329(2)	0.100(2)
n5-HT	NH ₂ lateral	0.125(2)	0.072(2)
	NH indol	0.349(2)	0.028(1)
	OH	0.367(2)	0.098(2)
p5-HT	NH ₃ ⁺ lateral	1.568(4)	0.043(1)
	NH indol	0.507(2)	0.050(1)
	OH	0.122(1)	0.168(2)

NH lateral. Para las moléculas cargadas y zwitteriónicas encontramos una interacción fuerte entre los átomos de hidrógeno de este grupo ($-\text{NH}_3^+$) con los átomos de oxígeno Op. La interacción más intensa se encontró para p5-HT (con un promedio de 1.56HB por molécula indólica). Esta fuerte interacción podría favorecer el anclaje de esta molécula, como se discutió anteriormente. Además, para el grupo amino lateral neutro de n5-HT, como era de esperar, el número de HB establecidos con Op fue un orden de magnitud inferior (0.13HB por molécula),

debido al menor número de hidrógenos ($-\text{NH}_2$). Por otra parte, la formación de HB con Oc fue considerablemente baja para las cuatro moléculas.

NH indol. La capacidad de la estructura indólica para formar HB explica las diferencias de comportamiento entre moléculas como Trp y otro aminoácido aromático como Phe [17]. El grupo benceno de Phe carece de un grupo dador de HB tal como es el NH indólico. Nuestros resultados mostraron valores de HB comparables (~ 0.36 HB) para Trp, n5-HT y 5-HTP, creciendo hasta $\sim 0.5\text{HB}$ para el p5-HT, por causa del anclaje de esta molécula en la región de los fosfatos. Por otro lado, la interacción HB con Oc fue bastante baja para las cuatro moléculas también para este grupo.

OH lateral. Este grupo no está presente en Trp. Las otras moléculas establecieron HB $\sim 30\%$ (5-HTP y n5-HT) y $\sim 10\%$ (p5-HT) del tiempo con Op, y 10-15% con Oc.

Por otro lado, las cuatro moléculas indólicas tienen la capacidad de formar HB con agua, ya que tienen grupos dadores y aceptores en sus estructuras. En la tabla 1.3 mostramos los HB formados con agua, por molécula. Es importante señalar que Trp y 5-HTP son zwitteriónicos y tienen un grupo carboxilato extra (COO^-) que es capaz de interactuar con las moléculas de agua.

Tabla 1.3. Número de enlaces de hidrógeno con agua

Sistema	Grupo	H ₂ O
Trp	NH_3^+ lateral	1.229(4)
	COO^- lateral	4.176(4)
	NH indol	0.312(2)
5-HTP	NH_3^+ lateral	1.541(4)
	COO^- lateral	4.105(4)
	NH indol	0.410(2)
	OH	0.779(3)
n5-HT	NH_3^+ lateral	0.913(4)
	NH indol	0.319(2)
	OH	0.779(3)
p5-HT	NH_2 lateral	1.045(3)
	NH indol	0.265(2)
	OH	0.725(3)

En forma global, podemos decir que 5-HTP fue la molécula que más interactuó con el agua a través de HB (~6.8). 5-HTP tiene mayor número de grupos polares en su estructura, y por consiguiente más grupos que necesitan estar hidratados. Tanto Trp y sobretodo 5-HTP, tuvieron mayor acceso a la fase acuosa, como observamos en el PDE (figura 1.5) y discutiremos a continuación. Nuestros resultados mostraron que el grupo COO^- interactuó fuertemente con agua formando ~4.1HB en promedio para ambas estructuras zwitteriónicas.

Podemos ver que 5-HT, en ambos estados de ionización, fue la molécula que formó menos HB con agua (~2.0). Por un lado, por la falta del grupo carboxilato. Por otro lado, el grupo $-\text{OH}$ formó mayor número de HB con agua que con POPC. Este grupo es bastante polar y necesita ser hidratado. Comparando la tabla 1.2 con la tabla 1.3, observamos que para 5-HT, la interacción de $-\text{OH}$ con agua fue considerablemente mayor que con Op y Oc. Este comportamiento fue particularmente más notable para p5-HT, dada la gran interacción del grupo amino lateral con Op.

Mirando el comportamiento de las otras moléculas, el número de HB formados con agua mostró buena correlación con la cantidad de grupos dadores y aceptores en su estructura y su estado de ionización. Además, el PDE detallado demostró la orientación preferencial de los grupos cargados (NH_3^+ y COO^-) en Trp y 5-HTP, y de NH_3^+ en p5-HT. El hecho de que estos grupos estuvieran más expuestos a la fase acuosa, explicó el mayor número de HB establecidos con agua: $5\text{-HTP} > \text{Trp} > \text{n5-HT} \approx \text{p5-HT}$, y que la mayor parte del tiempo de simulación estuvieran en contacto con moléculas de agua.

Teniendo en cuenta la localización de las moléculas en la bicapa lipídica y las interacciones específicas detalladas, fue importante analizar si estas moléculas atravesaron la membrana a través de la región interior hidrofóbica de la bicapa. A continuación analizamos las trayectorias de las moléculas indólicas durante el tiempo de simulación.

El análisis del PDE nos dio una primera idea de la distribución de las moléculas en la bicapa. En la mayoría de los casos, encontramos que las moléculas se distribuyeron entre la interfase

bicapa-agua, con acceso a la fase acuosa. Para obtener información más detallada de esta distribución, analizamos la trayectoria del centro de masa de las moléculas durante los 50ns de simulación. Los resultados se muestran en la figura 1.10. Mientras que las figuras 1.5 y 1.6 están centradas en el centro de la bicapa lipídica, en la figura 1.10, $z=0\text{\AA}$ corresponde al seno de la fase acuosa (considerando las condiciones periódicas de contorno). Es importante destacar que esta aproximación puede ser comparada con el caso de una vesícula multilamelar, ya que para la estimación de la cantidad de agua del sistema se consideró una bicapa lipídica completamente hidratada [25]. La comparación de las trayectorias con las condiciones de difusión en una membrana celular no es sencilla. Durante los 50ns de simulación no encontramos eventos de cruce de las moléculas a través de la región hidrofóbica de la bicapa. Los eventos de cruce se definen como el paso de la molécula de una monocapa lipídica a la otra, a través de la región hidrofóbica. Cabe destacar que 50ns es tiempo suficiente para que moléculas pequeñas atraviesen la bicapa lipídica: por ejemplo, algunos anestésicos locales (40 átomos) son capaces de atravesar una bicapa de POPC en una escala temporal menor (20 nanosegundos) [26].

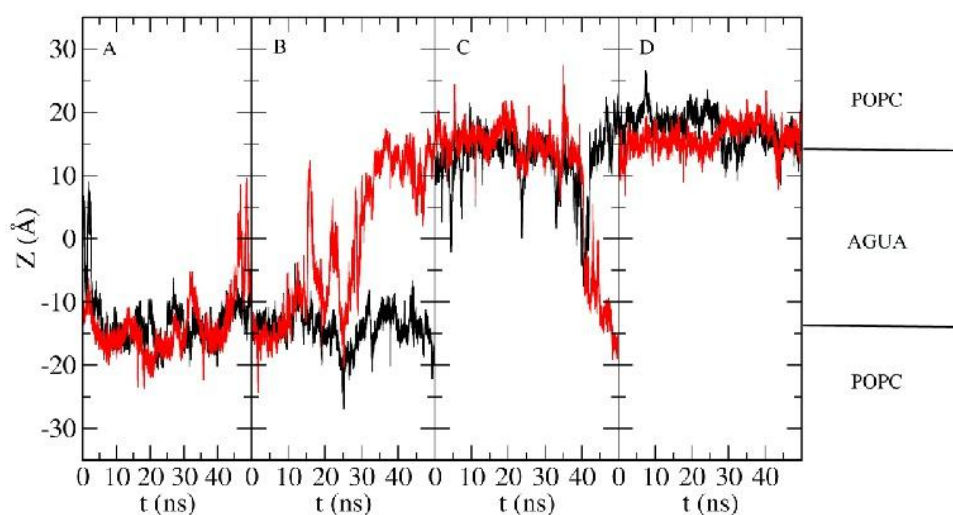


Figura 1.10. Trayectoria del centro de masa de las moléculas indólicas a lo largo del eje z. En rojo y negro se representa cada uno de las moléculas indólicas. A) Trp; B) 5-HTP; C) n5-HT; D) p5-HT. $z=0\text{\AA}$ corresponde al centro de la región acuosa.

En estos sistemas, observamos eventos de cruce a través de la región acuosa en tres de los cuatro casos. Cabe destacar que estos eventos se produjeron en sistemas estabilizados. El único sistema

para el que no se observaron estos eventos fue p5-HT. Como ya discutimos, este comportamiento está relacionado con que p5-HT estableció interacciones más intensas con la interfase, produciendo su anclaje en la región interfacial. En cambio, n5-HT no mostró interacciones específicas fuertes y no adoptó una orientación preferencial. Sin embargo, n5-HT atravesó eventual y rápidamente la fase acuosa, y volvió a entrar rápidamente a la bicapa. Por otro lado, las moléculas zwitteriónicas -especialmente 5-HTP- permanecieron más tiempo en el agua.

CONCLUSIONES

Los resultados discutidos muestran que las cuatro moléculas se encontraron preferentemente en la interfase bicapa-agua, algunas de ellas tuvieron acceso a la fase acuosa. Particularmente, las moléculas cargadas y zwitteriónicas mostraron una orientación preferencial dentro de la bicapa: el anillo aromático entró más profundamente en la región lipídica. En cambio, la serotonina neutra no adoptó orientación preferencial alguna.

Las principales interacciones que estabilizaron los sistemas estudiados fueron enlaces de hidrógeno, puente salino y catión- π . Los enlaces de hidrógeno se formaron esencialmente entre el grupo amino indólico, el amino lateral y el hidroxilo con el grupo fosfato de POPC y, en menor medida, con los grupos carbonilo. También se establecieron interacciones catión- π entre el indol y el grupo colina. De esta manera, la serotonina protonada se ancló a través interacciones fuertes y estables en la interfase bicapa-agua. Sin embargo, estas interacciones se desestabilizaron para las moléculas zwitteriónicas, por la presencia del grupo carboxilato que interactuó fuertemente con el agua. Las moléculas de indol y el Trp peptídico se localizan principalmente en la región de los carbonilos del glicerol (POPC), los aminoácidos libres muestran una localización ligeramente más externa en la interfase bicapa-agua, a nivel de los grupos fosfato y colina de POPC.

Durante el tiempo de simulación no observamos eventos de cruce a través de la región hidrofóbica de la bicapa para ninguna de las moléculas. En particular, es importante comentar

que incluso la molécula más “hidrofóbica” (serotonina neutra) fue incapaz de cruzar la bicapa. Este hecho guarda una adecuada correlación con la existencia de un transportador específico para 5-HT en BHE (*SERT*). Si la serotonina neutra tuviera la capacidad de difundir a través de la barrera, el equilibrio ácido-base podría desplazarse hacia la formación de la especie neutra (en medio acuoso), permitiendo que esta molécula cruce la BHE.

Además, nuestros resultados muestran un comportamiento muy similar entre los aminoácidos Trp y 5-HTP. Además de su similitud estructural, estas moléculas mostraron las mismas características en sus interacciones y su orientación preferencial en la interfase bicapa-agua, y en su capacidad de acceso a la fase acuosa. En la introducción mencionamos que 5-HTP podría pasar desde la circulación al SNC, a través de la BHE, mediante un mecanismo desconocido. Nuestros resultados sugieren que el mecanismo no es la difusión pasiva, ya que 5-HTP, así como Trp, fueron incapaces de atravesar la membrana modelo durante el tiempo de simulación. Particularmente, Trp utiliza el sistema transportador *LAT-1* para atravesar la BHE [27]. Este transportador también es utilizado por otros aminoácidos, como tirosina y L-dopa, para llegar al SNC [7], y potencialmente podría transportar 5-HTP. Efectivamente, la diferencia estructural entre tirosina y L-dopa es la misma que existe entre 5-HTP y Trp: la presencia de un sustituyente -OH en el anillo aromático.

Los resultados de este capítulo fueron publicados en: *Similarities and differences of serotonin and its precursors in their interactions with model membranes studied by molecular dynamics simulation*. J Mol Struct 1045 (2013):124-130.

REFERENCIAS

1. Hamel, E., *Serotonin and migraine: biology and clinical implications*. Cephalalgia, 2007. **27**(11): p. 1293-1300.
2. Nichols, D.E. and C.D. Nichols, *Serotonin Receptors*. Chemical Reviews, 2008. **108**(5): p. 1614-1641.
3. Turner, E.H., J.M. Loftis, and A.D. Blackwell, *Serotonin a la carte: Supplementation with the serotonin precursor 5-hydroxytryptophan*. Pharmacology and Therapeutics, 2006. **109**(3): p. 325-338.
4. Camfield, D.A., J. Sarris, and M. Berk, *Nutraceuticals in the treatment of Obsessive Compulsive Disorder (OCD): A review of mechanistic and clinical evidence*. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry, 2011. **35**(4): p. 887-895.
5. Birdsall, T.C., *5-Hydroxytryptophan: A Clinically-Effective Serotonin Precursor*. Alternative Medicine Review, 1998. **3**(4): p. 271-280.

6. Nakatani, Y., et al., *Augmented brain 5-HT crosses the blood-brain barrier through the 5-HT transporter in rat*. European Journal of Neuroscience, 2008. **27**(9): p. 2466-2472.
7. Gomes, P. and P. Soares-Da-Silva, *L-DOPA transport properties in an immortalised cell line of rat capillary cerebral endothelial cells, RBE 4*. Brain Research, 1999. **829**(1-2): p. 143-150.
8. Pardridge, W.M., *Blood-brain barrier drug targeting: the future of brain drug development*. Molecular interventions, 2003. **3**(2): p. 90-105, 51.
9. Boado, R.J., et al., *Selective expression of the large neutral amino acid transporter at the blood-brain barrier*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999. **96**(21): p. 12079-12084.
10. Echols, N., et al., *Comprehensive analysis of amino acid and nucleotide composition in eukaryotic genomes, comparing genes and pseudogenes*. Nucleic Acids Research, 2002. **30**(11): p. 2515-2523.
11. Von Heijne, G., *The membrane protein universe: What's out there and why bother?* Journal of Internal Medicine, 2007. **261**(6): p. 543-557.
12. MacCallum, J.L., W.F. Drew Bennett, and D. Peter Tieleman, *Distribution of amino acids in a lipid bilayer from computer simulations*. Biophysical Journal, 2008. **94**(9): p. 3393-3404.
13. White, S.H. and W.C. Wimley, *MEMBRANE PROTEIN FOLDING AND STABILITY: Physical Principles*. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, 1999. **28**(1): p. 319-365.
14. Grossfield, A. and T.B. Woolf, *Interaction of tryptophan analogs with POPC lipid bilayers investigated by molecular dynamics calculations*. Langmuir, 2002. **18**(1): p. 198-210.
15. Norman, K.E. and H. Nymeyer, *Indole localization in lipid membranes revealed by molecular simulation*. Biophysical Journal, 2006. **91**(6): p. 2046-2054.
16. Johansson, A.C.V. and E. Lindahl, *Amino-acid solvation structure in transmembrane helices from molecular dynamics simulations*. Biophysical Journal, 2006. **91**(12): p. 4450-4463.
17. Petersen, F.N.R., M.Ø. Jensen, and C.H. Nielsen, *Interfacial Tryptophan Residues: A Role for the Cation- π Effect?* Biophysical Journal. **89**(6): p. 3985-3996.
18. MacCallum, J.L., W.D. Bennett, and D.P. Tieleman, *Partitioning of amino acid side chains into lipid bilayers: results from computer simulations and comparison to experiment*. The Journal of general physiology, 2007. **129**(5): p. 371-377.
19. Alagona, G., C. Ghio, and P.I. Nagy, *Theoretical conformational analysis for neurotransmitters in the gas phase and in aqueous solution. Serotonin*. Journal of Chemical Theory and Computation, 2005. **1**(5): p. 801-816.
20. Martinez, L., et al., *PACKMOL: A package for building initial configurations for molecular dynamics simulations*. Journal of Computational Chemistry, 2009. **30**(13): p. 2157-2164.
21. Humphrey, W., A. Dalke, and K. Schulten, *VMD: Visual molecular dynamics*. Journal of Molecular Graphics, 1996. **14**(1): p. 33-38.
22. Pickholz, M., L.F. Fraceto, and E. De Paula, *Distribution of neutral prilocaine in a phospholipid bilayer: Insights from molecular dynamics simulations*. International Journal of Quantum Chemistry, 2008. **108**(13): p. 2386-2391.
23. Dougherty, D.A., *Cation- π Interactions Involving Aromatic Amino Acids*. The Journal of Nutrition, 2007. **137**(6): p. 1504S-1508S.
24. Mecozzi, S., A.P. West, and D.A. Dougherty, *Cation- π Interactions in Simple Aromatics: Electrostatics Provide a Predictive Tool*. Journal of the American Chemical Society, 1996. **118**(9): p. 2307-2308.
25. Kučerka, N., et al., *Structure of fully hydrated fluid phase DMPC and DLPC lipid bilayers using x-ray scattering from oriented multilamellar arrays and from unilamellar vesicles*. Biophysical Journal, 2005. **88**(4): p. 2626-2637.
26. Cabec, L.F., et al., *Liposome-prilocaine interaction mapping evaluated through STD NMR and molecular dynamics simulations*. Journal of Physical Chemistry B, 2009. **113**(8): p. 2365-2370.
27. Hargreaves, K.M. and W.M. Pardridge, *Neutral amino acid transport at the human blood-brain barrier*. Journal of Biological Chemistry, 1988. **263**(36): p. 19392-19397.

CAPITULO 2: EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE SUMATRIPTAN EN MEMBRANAS MODELO

MOTIVACIÓN

El prototipo sumatriptan (SMT) es uno de los triptanos más utilizados, desde su desarrollo y aun en la actualidad [1]. En la literatura se discute extensamente la limitación de SMT para atravesar la BHE [2] y la implicancia de su acceso al SNC en la eficacia antimigrañosa [3, 4]. A partir de la comprensión de sus limitaciones, es posible pensar mecanismos alternativos [5, 6] o estrategias para resolverlas [7, 8]. Mediante simulaciones de DM podemos acceder a nivel atómico-molecular al comportamiento de SMT en bicapas, como modelos de BHE. A priori, por los datos de literatura y el comportamiento observado para compuestos similares (ver capítulo 1), podemos pensar que SMT va a tener dificultad de atravesar la membrana. Sin embargo, es importante estudiar su comportamiento particular por la presencia de sustituyentes diferentes. A baja concentración se espera obtener resultados similares a otros compuestos indólicos. En esa dirección, estudiaremos SMT a altas concentraciones apuntando a ver la dependencia de su partición e interacción con efectos cooperativos [9].

Dado el pKa de SMT (9.63), la especie cargada predomina en un amplio rango de pH [10]. Considerando la ecuación de Henderson-Hasselbach, hay un 99.3% de moléculas protonadas a pH fisiológico. Por lo tanto, centramos nuestra atención en la forma protonada de SMT (pSMT) (figura 2.1).

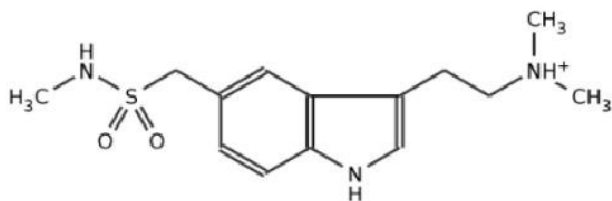


Figura 2.1. Estructura de 1-[3-(2-dimetilaminoetil)-1H-indol-5-il]-N-metil-metanosulfonamida: Sumatriptan, en su forma protonada (pSMT).

En esta parte del trabajo buscamos comprender la forma en que sumatriptan protonado interactúa con los lípidos en bicapas modelo de POPC. Este análisis puede proporcionar información

relevante, como por ejemplo, su localización en membranas y capacidad de difusión a través de ellas. Específicamente, en este capítulo evaluamos los principales efectos de concentración de sumatriptan protonado sobre las propiedades físicas de las membranas modelo, así como las interacciones específicas responsables por su comportamiento físico-químico.

SIMULACIONES

Llevamos a cabo tres series de simulaciones, a diferentes concentraciones pSMT:POPC: a) 1:75, b) 1:10 y c) 1:3. En todos los casos, las moléculas de pSMT se colocaron originalmente en la fase acuosa. Las simulaciones se llevaron a cabo durante 100ns.

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Para el análisis estadístico de la mayoría de las propiedades, consideramos los últimos 50ns de simulación, después de verificar su convergencia.

Evaluamos el orden interfacial del sistema por medio del perfil de densidad electrónico (PDE) normal a la bicapa (eje z), para los tres casos estudiados ($z=0\text{\AA}$ corresponde al centro de la membrana) (figura 2.2). Las bicapas de POPC se muestran en negro, el agua en azul y pSMT en rojo.

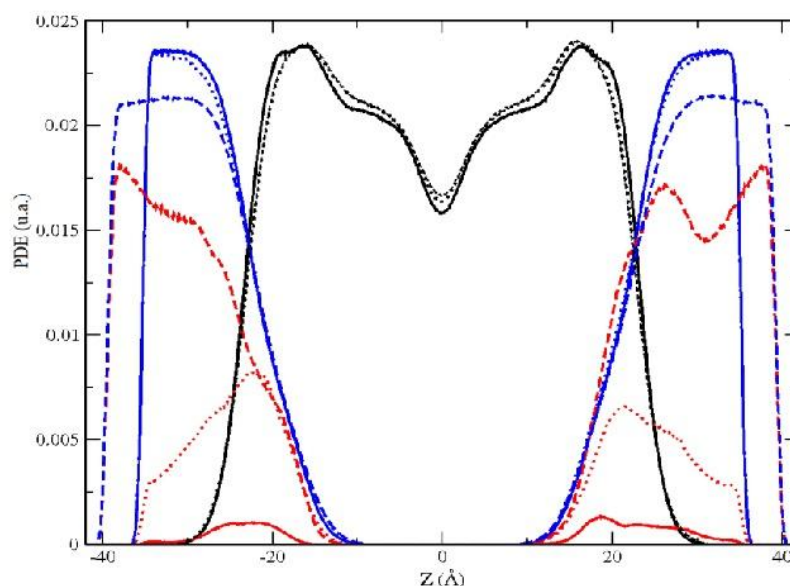


Figura 2.2. Superposición de los perfiles de densidad electrónica para todas las concentraciones: 1:75, líneas continuas; 1:10, líneas punteadas; 1:3, líneas discontinuas. La densidad de POPC se representa en negro, el agua en azul y pSMT en rojo (ampliado 5 veces para facilitar la visualización). $z=0\text{\AA}$ corresponde al centro de la bicapa.

Observamos que pSMT particionó entre el agua y la interfase bicapa-agua, sin acceder a la región de las colas hidrofóbicas. El aumento de concentración de pSMT condujo a un aumento en la partición entre estas fases. El porcentaje de pSMT en la fase acuosa creció de 20% a 32% y a 63% (1:75, 1:10 y 1:3 respectivamente).

Una estimación aproximada de la energía libre de partición entre la fase acuosa y la membrana se puede obtener a través de la ecuación

$$\Delta\Delta G_{w-m} = -KT \ln \left(\frac{C_w}{C_m} \right) \quad [11]$$

dónde C_w y C_m son las concentraciones medias de fármaco en agua y en membrana, respectivamente. Los valores calculados fueron 3.4 ± 0.4 (1:75), 2.0 ± 0.3 (1:10) y -1.4 ± 0.3 (1:3) kJ/mol. El cambio de signo de la energía libre con la concentración indicó un cambio de afinidad por la fase de membrana (1:75, 1:10) a la fase acuosa (1:3). El equilibrio de afinidad de pSMT por ambas fases, estimado mediante regresión lineal, se alcanza a una relación fármaco:lípido de $\sim 1:4$. Existen métodos más precisos para obtener información detallada de los perfiles de energía libre de pSMT a través de toda la bicapa lipídica (*steered molecular dynamics*, SMD [19] o *adaptive biased force*, ABF [12, 13]).

Para la concentración 1:3, el PDE de pSMT mostró picos a $\pm 26 \text{ \AA}$ en la interfase bicapa-agua. La presencia de estos picos sugiere la interacción de pSMT con la bicapa desde la fase acuosa, que discutiremos más adelante.

Por otra parte, la organización de la bicapa de POPC fue levemente afectada por las diferentes concentraciones de pSMT. Con el fin de revelar el origen de este efecto analizamos diferentes propiedades, como el área por lípido, el parámetro de orden de las colas lipídicas y el potencial de superficie. La presencia de moléculas de pSMT en la interfase bicapa-agua condujo a una expansión lateral de la bicapa y una concomitante desorganización de las colas lipídicas con el aumento de la concentración. Observamos un leve aumento en el área por lípido (de 59.3 ± 0.1 a $60.7 \pm 0.1 \text{ \AA}^2$ para 1:10 y 1:3, respectivamente). Respecto del parámetro de orden, observamos que

a 1:10 y 1:3, pSMT desorganizó ambas cadenas hidrocarbonadas (figura 2.3), de manera similar. La desorganización fue mayor en la región más superficial, en las cabezas polares, que en la región más profunda e hidrofóbica de la bicapa. Sin embargo, el efecto directo debido a la presencia de pSMT en la región de las cabezas, se puede manifestar indirectamente en los metilenos terminales de las cadenas hidrocarbonadas. pSMT prácticamente no afectó esta propiedad a la concentración 1:75. Los cambios más pronunciados en la cadena oleoil se debieron mayormente al desorden intrínseco de la cadena insaturada.

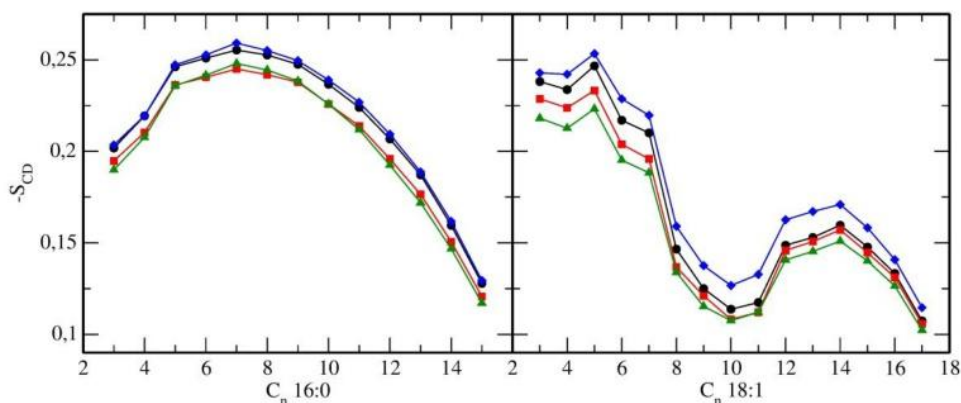


Figura 2.3. Parámetro de orden de POPC para todas las concentraciones: 1:75 (círculos negros), 1:10 (cuadrados rojos), 1:3 (triángulos verdes) y bicapa pura de POPC (rombos azules) (líneas sin sentido físico). 16:0: cadena saturada palmitoil y 18:1: cadena insaturada oleoil.

La desorganización y la leve expansión lateral de POPC, sumadas a la gran cantidad de moléculas de pSMT en cercanía de los grupos fosfato y colina, pueden afectar otra propiedad característica de las bicapas: el potencial electrostático. Con el fin de analizar este efecto integramos los perfiles de carga de la bicapa (figura 2.4) y los comparamos con el perfil de potencial electrostático de una bicapa POPC pura. La polarización de POPC en presencia de pSMT aumentó con respecto a la bicapa pura. Como era esperable, para el caso 1:75 se vio un cambio leve ($\sim 0.05V$), debido al efecto meramente local sobre los grupos polares de POPC. Por otro lado, en los casos 1:10 y 1:3 se apreció un notable aumento en el potencial de POPC ($\sim 0.10V$). De manera similar al parámetro de orden, el potencial electrostático coincidió para estos dos casos. El número de moléculas fuertemente asociadas a la interfase, y capaces de afectar ambas propiedades, fue similar para ambos casos, como discutiremos más adelante.

Resta analizar los efectos de la concentración de pSMT en la interacción del fármaco con las cabezas lipídicas, para entender más profundamente la naturaleza de los cambios en el potencial electrostático y el parámetro de orden de las cadenas hidrocarbonadas.

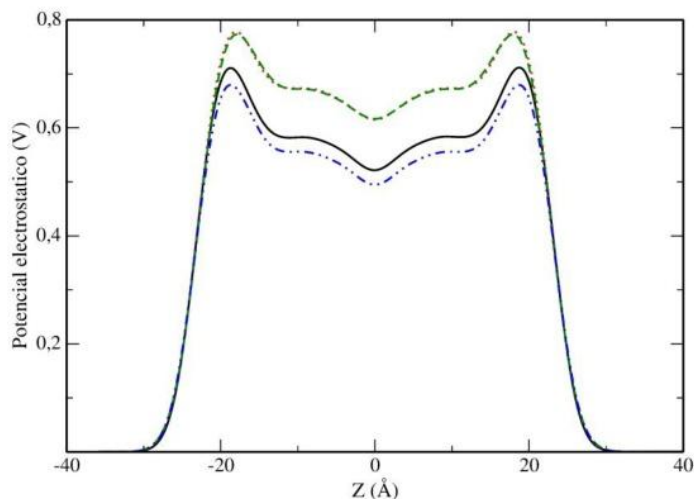


Figura 2.4. Superposición del potencial electrostático de POPC para todas las concentraciones: 1:75 (negro sólido), 1:10 (rojo punteado), 1:3 (verde traceado) y bicapa pura de POPC (azul punteado). $z=0\text{\AA}$ corresponde al centro de la bicapa.

El análisis realizado para serotonina y otras moléculas indólicas, mostró que las principales interacciones con la bicapa lipídica fueron catión- π , puente salino y enlaces de hidrógeno.

La formación de puente salino entre los átomos N del grupo amino lateral (pSMT) y P del grupo fosfato (POPC), fue calculada mediante la función de distribución radial. En la figura 2.5 mostramos el $g(r)$ para las tres concentraciones. Observamos dos picos bien definidos a $\sim 4.0\text{\AA}$ y $\sim 4.7\text{\AA}$, respectivamente, como evidencia de la formación de puente salino. La presencia de un primer pico a $\sim 4.0\text{\AA}$ se atribuyó a la presencia del átomo de hidrógeno que lleva el grupo amino protonado, equivalente a los átomos de hidrógeno del grupo amino primario en moléculas como serotonina protonada (capítulo 1). En cambio, el pico a $\sim 4.7\text{\AA}$ se debió a efectos estéricos causados por los grupos metilo sustituyentes en el grupo amino cargado de pSMT. A baja concentración (1:75) vimos un comportamiento similar al de la serotonina (capítulo 1). La principal diferencia entre pSMT (y p5-HT) y las otras moléculas estudiadas en el capítulo 1, es que las moléculas protonadas se anclaron a la interfase por la formación de puente salino. También observamos que la intensidad de esta interacción disminuyó con el aumento de la

concentración, por la menor proporción de moléculas en la interfase.

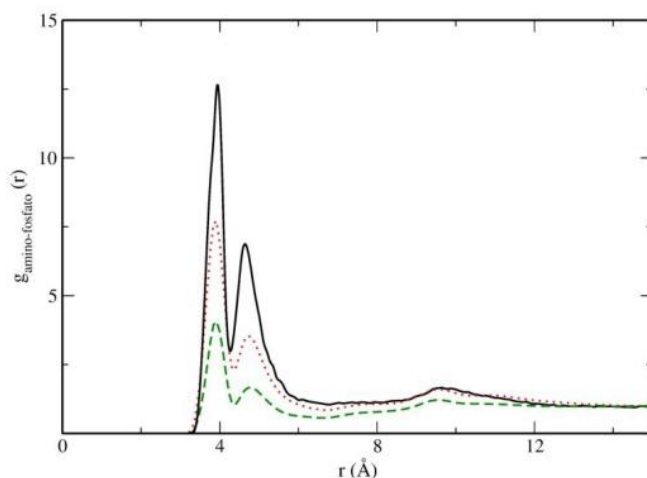


Figura 2.5. Función de distribución radial para los tres sistemas. El par de átomos considerado es el átomo N (grupo amino lateral, pSMT) y el átomo P (grupo fosfato, POPC). 1:75 en negro, 1:10 en rojo y 1:3 en verde.

Como ya vimos en el capítulo 1, la interacción catión- π permite a las moléculas indólicas adoptar una ubicación interfacial en bicapas lipídicas. Estudiamos esta interacción a partir del cálculo de la función de distribución radial para las tres concentraciones. En la figura 2.6, observamos un pico bien definido a $\sim 4.0 \text{ \AA}$ para todos los casos. Al igual que para puente salino, la intensidad de la interacción catión- π (por molécula de pSMT) disminuyó con la concentración.

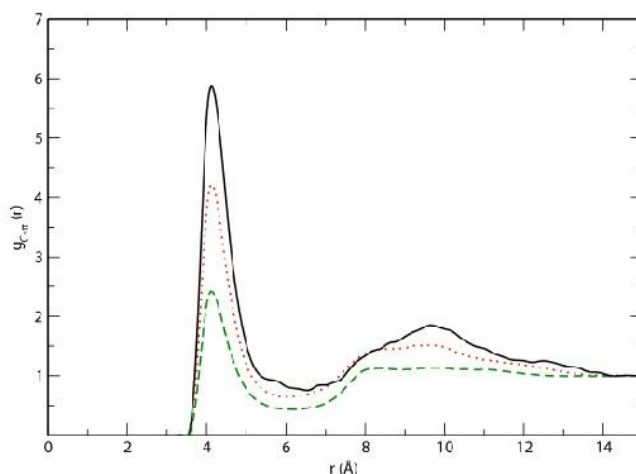


Figura 2.6. Función de distribución radial para los tres sistemas. El par de átomos considerado es el centroide del anillo bencénico (indol, pSMT) y el átomo N cargado (colina, POPC). 1:75 en negro, 1:10 en rojo y 1:3 en verde.

El anillo indólico es capaz de formar, también, enlaces de hidrógeno debido a la presencia del grupo NH. Calculamos la función de distribución radial entre el átomo de H del amino indólico (pSMT) y los átomos de oxígeno del grupo fosfato (POPC) (figura 2.7). Observamos un pico

definido a $\sim 1.7\text{\AA}$ en todos los casos, que coincide con la distancia característica de la interacción de enlace de hidrógeno.

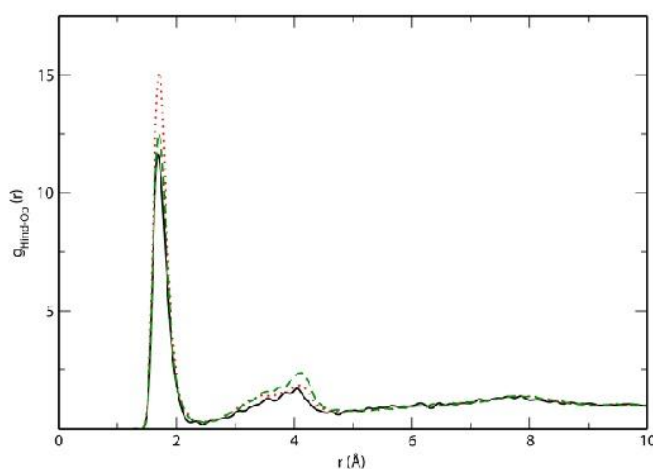


Figura 2.7. Función de distribución radial para los tres sistemas. El par de átomos considerado es el átomo H (NH indol, pSMT) y los átomos Op (grupo fosfato, POPC). 1:75 en negro, 1:10 en rojo y 1:3 en verde.

El número de HB establecido por un par seleccionado se determinó promediando por el número de pares y por el tiempo de simulación (50ns). Calculamos el número de HB entre Op y Oc (POPC) y 3 grupos dadores de pSMT (amino lateral, NH indol y NH sulfonamida), para las tres concentraciones. La formación HB con el Oc fue considerablemente baja para todas las concentraciones consideradas, al igual que lo observado para serotonina. Mostramos el número medio de HB entre distintos grupos NH (pSMT) y Op (POPC) en la figura 2.8.

NH lateral. Los HB entre Op y NH lateral prevalecieron frente a otros pares, para las tres concentraciones estudiadas. La interacción más fuerte la encontramos para el caso 1:75 (0.61HB). El grupo NH lateral de pSMT tiene un solo átomo de hidrógeno capaz de interactuar por medio de HB con Op. Este valor fue comparable con el caso de p5-HT que forma 1.57HB con Op, a través de tres átomos de hidrógeno capaces de interactuar en este grupo amino (capítulo 1). Esta fuerte interacción podría ser uno de los factores de anclaje discutido anteriormente, explicando la distribución particular de pSMT en el PDE: para la concentración 1:75 encontramos que pSMT permaneció un $\sim 78\%$ del tiempo en la interfase lípido-agua. A medida que aumentó la concentración de pSMT, encontramos una disminución del número de

HB por molécula (hasta 0.20 para el caso 1:3) debido al mayor número de moléculas presentes en la fase acuosa.

NH indol. Tal como discutimos para el $g(r)$ (figura 2.7), la interacción entre estos grupos fue ligeramente afectada por la concentración. Los valores de HB del par NHindol-Op fueron muy similares entre los casos 1:75 e 1:10 (0.25-0.27). Sin embargo, esta interacción fue más débil que para serotonina en condiciones similares (0.5HB por molécula, concentración 1:75, capítulo 1). En el caso 1:3 se estableció un número menor de HB por pSMT para el par NHindol-Op (0.15). Sin embargo, ese número de HB lo establecieron solo un 37% del total de las moléculas de pSMT, por lo que la concentración fortaleció este tipo de interacción.

NH sulfonamida. Observamos una ligera disminución del número de HB por molécula con el aumento de la concentración. Este grupo mostró la interacción más débil con Op (figura 2.8).

A modo de resumen, observamos dos tendencias para las interacciones HB con Op con el aumento de la concentración: una pérdida de intensidad (principalmente para NH lateral y sulfonamida) y una pérdida de especificidad (entre los diferentes grupos amino con Op).

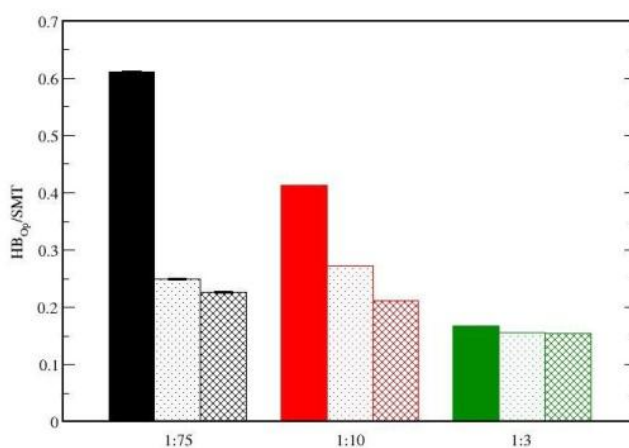


Figura 2.8. Número medio de HB por molécula de pSMT con Op (grupo fosfato, POPC) para distintos grupos de pSMT: NH lateral (lleno), NH indol (punteado) y NH sulfonamida (cuadrículado); 1:75 en negro, 1:10 en rojo y 1:3 en verde.

pSMT tiene la capacidad de formar enlaces de hidrógeno también con el agua, ya que tiene grupos dadores y aceptores de HB en su estructura. El número medio de HB formados por pSMT con agua se muestra en la figura 2.9. De manera equivalente a los grupos carboxilato e hidroxilo de los aminoácidos Trp, 5-HTP y serotonina, en pSMT el grupo sulfonamida tiene un grupo $-SO_2$

capaz de interactuar con los átomos de hidrógeno en las moléculas de agua. Observamos que las interacciones más fuertes con agua las estableció $-\text{SO}_2$ ya que puede formar HB con más de una molécula de agua al mismo tiempo. Además, $-\text{SO}_2$ es bastante polar y actúa como aceptor cuando se hidrata. La polaridad de $-\text{SO}_2$ será discutida en los capítulos siguientes. La interacción $-\text{SO}_2$ -agua creció con la concentración, debido al creciente número de pSMT en la fase acuosa. Para el caso 1:3, donde pSMT tuvo más acceso al agua, el número de HB con agua fue muy similar para los tres grupos amino, mostrando un alto grado de hidratación.

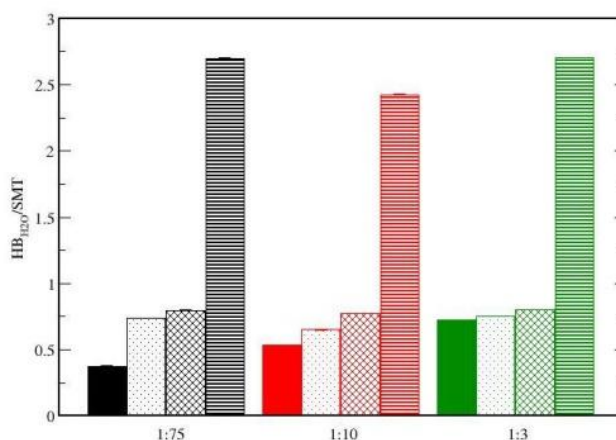


Figura 2.9. Número medio de HB por molécula de pSMT con agua para distintos grupos de pSMT: amino lateral lleno, NH indol punteado, NH sulfonamida cuadriculado y SO_2 sulfonamida rayado; 1:75 en negro, 1:10 en rojo y 1:3 en verde.

Con el fin de evaluar el comportamiento de cada molécula individual de pSMT, seguimos la evolución temporal del centro de masa de pSMT a lo largo de la coordenada z del sistema para las tres concentraciones. Es importante destacar que ninguna molécula cruzó de una monocapa a la otra a través de la región de las colas hidrófobas, al igual que 5-HT. En cuanto a las trayectorias individuales de pSMT, pudimos distinguir tres comportamientos principales en función de su dinámica dentro del sistema:

- 1) interfaciales: moléculas de pSMT en la interfase agua-cabezas polares (figura 2.10.A);
- 2) libres (en la fase acuosa): moléculas de pSMT hidratadas por moléculas de agua, mostraron movimiento rápido (figura 2.10.B);
- 3) ancladas (en la fase acuosa): moléculas de pSMT en la fase acuosa, pero con movimiento más restringido, interactuando con las cabezas lipídicas desde la fase acuosa (figura 2.10.C).

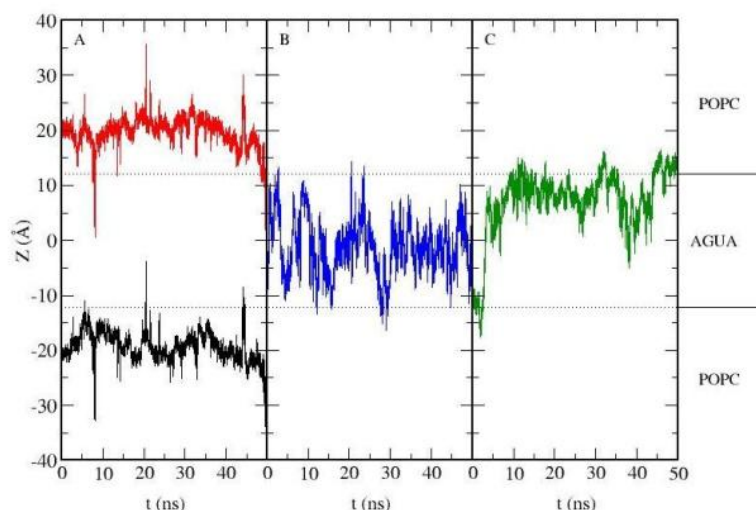


Figura 2.10. Trayectoria en el eje z del centro de masa de moléculas de pSMT representativas. $z=0\text{Å}$ corresponde al centro de la fase acuosa. Los diferentes comportamientos se muestran en A) interfacial, B) libre (en fase acuosa), y C) anclada (en fase acuosa).

Como ya mencionamos, las moléculas de pSMT particionaron entre la fase acuosa y la interfase bicapa-agua. Esta distribución hizo posible un comportamiento peculiar: la interacción con los grupos de cabeza polar desde la fase acuosa. Al mismo tiempo que la molécula de pSMT estaba hidratada e interactuaba con el agua, se aproximaba a la interfase e interactuaba con los grupos de cabeza polar. Algunas moléculas de pSMT parecieron estar ancladas en la región del agua cerca de la interfase. Este comportamiento explicaría los picos observados en la distribución de pSMT en la fase acuosa cerca de la interfase, especialmente para el caso 1:3. Cabe destacar que muchas moléculas individuales mostraron una combinación de estos tres comportamientos durante el tiempo de simulación.

CONCLUSIONES

Por lo que sabemos, no hay datos disponibles en la literatura sobre el coeficiente de partición membrana/agua para sumatriptán. Nosotros observamos que pSMT particionó entre la fase acuosa y la interfase bicapa-agua, y no tuvo acceso a la región hidrófoba de la membrana. En particular, nuestros resultados indican para pSMT mayor afinidad por la fase acuosa con el aumento de concentración. Este comportamiento es comparable con los valores disponibles de coeficiente de partición en el sistema *n*-octanol/agua [10, 14, 15]. Sin embargo, pSMT presentó

una gran interacción con las cabezas polares de POPC. El sistema *n*-octanol/agua, al carecer de estos grupos y de la anisotropía de la bicapa lipídica, ofrece una idea sesgada de la afinidad del fármaco [16].

La partición entre la fase acuosa y la interfase aumentó con la concentración, así como la cantidad de moléculas de pSMT en la interfase. El elevado número de moléculas de pSMT en fase acuosa a la concentración intermedia no pareció deberse a la saturación de la interfase. Además, no todas las moléculas localizadas, aparentemente, en la interfase, interactuaron de la misma manera con los grupos polares de POPC ni modificaron de igual modo sus propiedades. Por ejemplo, observamos que algunas de las moléculas permanecieron interactuando con las cabezas de los lípidos desde la fase acuosa (pSMT ancladas en agua). Este fenómeno se acentuó a alta concentración.

pSMT es un derivado de indol: al igual que 5-HT, adoptó una ubicación interfacial en membranas modelo y fue capaz de interactuar de manera similar a 5-HT con bicapas lipídicas. Las principales interacciones específicas entre pSMT y las cabezas polares de POPC fueron catión- π , puente salino y enlaces de hidrógeno. La intensidad de las interacciones dependió de la concentración. Por ejemplo, el número de interacciones catión- π y puente salino por molécula disminuyó con la concentración. Para las interacciones HB con oxígenos del fosfato, observamos dos tendencias con el aumento de la concentración: una pérdida de fuerza (para los grupos amino lateral y sulfonamida) y una pérdida de especificidad (entre los diferentes grupos amino).

Con el aumento de concentración, pSMT produjo leves cambios en el área por lípido y modificó considerablemente la organización de las colas hidrocarbonadas y el potencial de superficie.

Las limitaciones de pSMT para atravesar membranas están esencialmente relacionadas con la presencia de grupos cargados y grupos de anclaje, que interactúan con los grupos de cabeza polar y el agua. Estas interacciones, sumadas a la alta densidad de la región interfacial, no permiten que la estructura del fármaco penetre en regiones más profundas, como las colas hidrocarbonadas. Por otro lado, considerando el valor de pKa de sumatriptan, es raro que se

desprotone en condiciones fisiológicas. Sin embargo, el equilibrio de disociación/asociación de carga en moléculas ionizables y fármacos puede verse desplazado en entornos como la bicapa lipídica [17, 18]. Específicamente, el pKa aparente de compuestos cargados positivamente puede disminuir en presencia de membranas zwitteriónicas [18, 19]. Por lo tanto, considerar la interacción de triptanos neutros con membranas modelo podría proporcionar información adicional a la presente discusión.

Los resultados de este capítulo fueron publicados en: *Concentration effects of sumatriptan on the properties of model membranes by molecular dynamics simulations*. Eur Biophys J 42 (2013):833-841.

REFERENCIAS

1. Humphrey, P.P.A., et al., *Serotonin and Migraine*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1990. **600**(1): p. 587-598.
2. Kaube, H., K.L. Hoskin, and P.J. Goadsby, *Inhibition by sumatriptan of central trigeminal neurones only after blood-brain barrier disruption*. British Journal of Pharmacology, 1993. **109**(3): p. 788-792.
3. Connor, H., *Building on the Sumatriptan Experience: The Development of Naratriptan*. Cephalalgia, 2001. **21**(1 suppl): p. 32-34.
4. Pascual, J. and P. Muñoz, *Correlation between lipophilicity and triptan outcomes*. Headache, 2005. **45**(1): p. 3-6.
5. Pardridge, W.M., *Blood-brain barrier delivery*. Drug Discovery Today, 2007. **12**(1-2): p. 54-61.
6. Cheng, Z., et al., *Hydrophilic anti-migraine triptans are substrates for OATP1A2, a transporter expressed at human blood-brain barrier*. Xenobiotica, 2012. **42**(9): p. 880-890.
7. Batrakova, E.V. and A.V. Kabanov, *Pluronic block copolymers: Evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers*. Journal of Controlled Release, 2008. **130**(2): p. 98-106.
8. Oshiro, A., et al., *Pluronics F-127/L-81 Binary Hydrogels as Drug-Delivery Systems: Influence of Physicochemical Aspects on Release Kinetics and Cytotoxicity*. Langmuir, 2014. **30**(45): p. 13689-13698.
9. Buckley, S.T., et al., *In vitro models to evaluate the permeability of poorly soluble drug entities: Challenges and perspectives*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2012. **45**(3): p. 235-250.
10. Wojnar-Horton, R.E., et al., *Distribution and excretion of sumatriptan in human milk*. British Journal of Clinical Pharmacology, 1996. **41**(3): p. 217-221.
11. Marrink, S.J. and H.J.C. Berendsen, *Simulation of water transport through a lipid membrane*. Journal of Physical Chemistry, 1994. **98**(15): p. 4155-4168.
12. Izrailev, S., et al., *Steered Molecular Dynamics*, in *Computational Molecular Dynamics: Challenges, Methods, Ideas*, P. Deuflhard, et al., Editors. 1999, Springer Berlin Heidelberg. p. 39-65.
13. Darve, E. and A. Pohorille, *Calculating free energies using average force*. The Journal of Chemical Physics, 2001. **115**(20): p. 9169-9183.
14. Fox, A.W. and Ffpm, *Comparative Tolerability of Oral 5-HT_{1B/1D} Agonists*. Headache: The Journal of Head and Face Pain, 2000. **40**(7): p. 521-527.
15. Balaguer-Fernández, C., et al., *Development and evaluation of occlusive systems employing polyvinyl alcohol for transdermal delivery of sumatriptan succinate*. Drug Delivery, 2010. **17**(2): p. 83-91.
16. Austin, R.P., A.M. Davis, and C.N. Manners, *Partitioning of ionizing molecules between aqueous buffers and phospholipid vesicles*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1995. **84**(10): p. 1180-1183.
17. Avdeef, A., et al., *pH-Metric logP 10. Determination of Liposomal Membrane-Water Partition Coefficients of Ionizable Drugs*. Pharmaceutical Research, 1998. **15**(2): p. 209-215.
18. Malheiros, S.V.P., et al., *A new look at the hemolytic effect of local anesthetics, considering their real membrane/water partitioning at pH 7.4*. Biophysical Chemistry, 2004. **110**(3): p. 213-221.

CAPITULO 3: EFECTO DE LAS CONDICIONES INICIALES Y EL ESTADO DE IONIZACIÓN DE NARATRIPTAN EN MEMBRANAS MODELO

MOTIVACION

Naratriptan (NRT) fue desarrollado como una alternativa para el tratamiento de la migraña [1] en pacientes con respuesta desfavorable al SMT oral [2]. En NRT, el sustituyente N-metil-piperidina (figura 3.1), le confiere mayor biodisponibilidad oral y estabilidad metabólica [1, 3]. Las principales ventajas farmacocinéticas de NRT frente al prototipo SMT [4] -menor tasa de recurrencia y mayor vida media plasmática [1, 5, 6]-, permiten su uso en cefaleas prolongadas [7, 8]. Se postula que las modificaciones estructurales le confieren a NRT mayor lipofilicidad y, consecuentemente, mayor acción a nivel del SNC [1, 3] y eficacia durante la fase de aura [3, 8]. Sin embargo, la concentración encefálica de NRT medida experimentalmente es similar a la de SMT [3].

La forma de ionización predominante de NRT a pH fisiológico es la protonada (pK_a 9,70 [9]), como ya fue discutido para SMT. Se sugiere que, dado su mayor coeficiente de partición en *n*-octanol/agua [10], los compuestos neutros tienen mayor partición en membrana que sus formas cargadas. Aunque el pK_a de fármacos ionizables puede cambiar en el contexto de la membrana (pK_a aparente), afectando su partición [11-13]. Por ello, aunque a pH fisiológico la proporción de triptanos en forma neutra es muy baja, resulta importante entender su comportamiento en membrana [11, 14-16]. Sin embargo, el estudio del comportamiento de triptanos neutros a nivel experimental, se ve limitado por la inestabilidad de las membranas a pH muy básico (pH ~11-12) [15, 17]. En este sentido, las simulaciones computacionales resultan una herramienta muy poderosa para acceder a dicha información.

En el capítulo anterior, discutimos la limitación de pSMT para atravesar la interfase bicapa-agua e ingresar a la región hidrofóbica, en parte porque se ancla en la interfase a través de diversas interacciones específicas, así como por su carga neta [16, 17]. Por eso, en este capítulo nos

propusimos estudiar el comportamiento de NRT en dos estados de ionización [14, 17] y partiendo de diferentes entornos, con distintas propiedades dinámicas [17-19]. En particular, centramos nuestra atención en el estudio de NRT en membranas modelo a alta relación fármaco:lipido (1:3), con el objetivo de considerar concentraciones clínicamente relevantes y observar efectos cooperativos en la partición [13, 14, 18, 20].

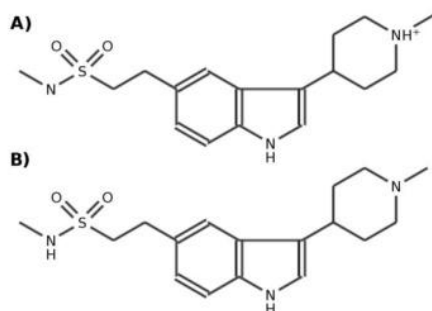


Figura 3.1. Estructura de N-metil-3-(1-metil-4-piperidinil)-1H-indol-5-etanosulfonamida (naratriptan, NRT) en forma a) neutra (nNRT) y b) protonada (pNRT). a) y b) difieren en el estado de ionización del anillo N-metil-piperidina.

SIMULACIONES

Realizamos simulaciones en membranas modelo en presencia de NRT en sus formas protonada (pNRT) y neutra (nNRT), a concentración 1:3 (NRT:POPC). Las moléculas de NRT se colocaron inicialmente en dos ambientes diferentes: fase acuosa (condición inicial -W) y centro de la bicapa lipídica (condición inicial -C). Al igual que para SMT, no había parámetros disponibles para NRT. La optimización de estructura y parametrización de pNRT y nNRT se realizaron de manera similar a pSMT y otros compuestos indólicos (capítulos 1 y 2). Las simulaciones se llevaron a cabo hasta 150ns.

ANALISIS DE RESULTADOS

A continuación, discutimos los resultados obtenidos para los últimos 100ns de simulación de pNRT y nNRT en bicapas de POPC, desde dos condiciones iniciales diferentes. Con fines de comparación, incluimos los resultados para una bicapa lipídica de POPC pura. Analizamos los principales efectos de NRT en la organización y las propiedades físicas de POPC, así como las interacciones específicas entre distintos componentes del sistema.

Con el objeto de ilustrar el comportamiento de NRT en una bicapa hidratada de POPC, calculamos algunas propiedades del sistema. En la tabla 3.1 mostramos el área por lípido (A_{lip}), para todos los casos estudiados. Para la condición -C, observamos un cambio notable de A_{lip} en presencia de la especie protonada ($\sim 6\text{\AA}^2$) y la neutra ($\sim 12\text{\AA}^2$). Sin embargo, esta propiedad no fue afectada apreciablemente en la condición -W. La diferencia en A_{lip} se puede atribuir a diferente localización y orientación de las moléculas de fármaco en la bicapa, como discutiremos a continuación. Las diferencias en la dimensión z de la caja de simulación se compensaron con los cambios en A_{lip} , originando pequeños cambios en el volumen de la caja.

Tabla 3.1. Propiedades de la caja de simulación y la bicapa de POPC.

	$A_{lip}(\text{\AA}^2)(\text{error})$	Dimensión z(\AA) (error)	$V(\text{\AA}^3)$
POPC pura	59.04(1)	70.60(1)*	~*
pNRT-W	59.19(1)	81.20(1)	360493
pNRT-C	65.94(1)	72.92(1)	360650
nNRT-W	59.01(1)	81.30(1)	359823
nNRT-C	70.89(1)	67.72(1)	360065

* Menor cantidad de moléculas de agua por ausencia de fármaco.

Evaluamos la distribución de los componentes del sistema mediante el perfil de densidad de electrones (PDE) normal a la bicapa (coordenada z). $z=0\text{\AA}$ corresponde al centro de la membrana. En la figura 3.2 comparamos los PDE de los diferentes sistemas: A) pNRT y B) nNRT. POPC se muestra en negro, agua en azul, pNRT en rojo y nNRT en verde. De acuerdo con la discusión anterior, para la condición -W, la expansión de la caja en la dimensión z se puso de manifiesto en la densidad de POPC.

Para ambas formas de ionización de NRT, la distribución dependió fuertemente de las condiciones iniciales. Desde la condición inicial -W, NRT se distribuyó entre el agua y la interfase bicapa-agua. A partir de esta condición, observamos menor partición en la interfase para nNRT que pNRT. Además, nNRT mostró cierto grado de acceso a la región hidrofóbica. En cambio, desde la condición -C, para nNRT observamos una distribución bimodal de las

moléculas de fármaco dentro de la región hidrofóbica, con acceso a la interfase. El resultado para pNRT-C fue bastante diferente. Si bien la mayor parte de las moléculas migró en pocos nanosegundos (~ 35 ns) hacia la interfase y el agua, también observamos, en el interior de la bicapa, una cantidad de moléculas de pNRT con densidad uniforme. Este resultado será discutido más detalladamente en el capítulo siguiente. Además, desde la condición

-C, encontramos una notable cantidad de agua dentro de la bicapa, especialmente para el caso pNRT-C [14]. La presencia del fármaco en la región hidrofóbica fue responsable por el arrastre de agua a esta región y por la alteración del perfil de densidad de POPC.

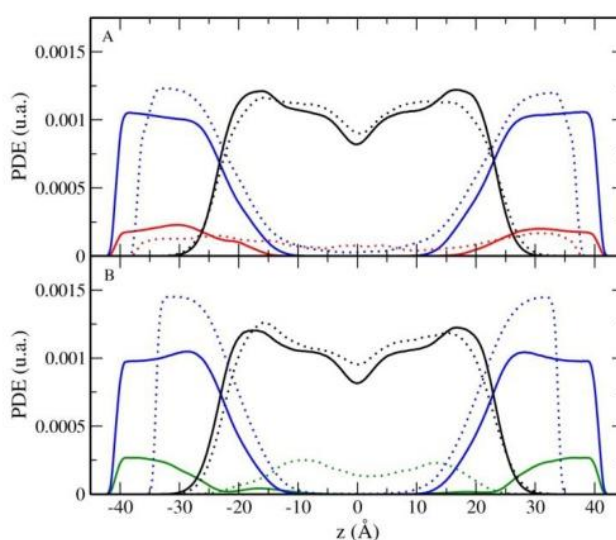


Figura 3.2. Perfil de densidad electrónica (PDE) de los sistemas estudiados. La densidad de POPC se muestra en negro, agua en azul, pNRT en rojo y nNRT en verde. Condición -W (líneas llenas) y -C (líneas punteadas). $z=0\text{Å}$ corresponde al centro de la bicapa.

Para tener una idea de la hidratación de POPC estimamos, por integración del PDE, el número de moléculas de agua en diferentes regiones de la bicapa. El número de moléculas de agua que interactuaron con la bicapa, N_{WTI} , se obtuvo integrando la región donde la densidad del agua fuera menor al 90% del agua *bulk* (por fuera de la bicapa). Como se mencionó anteriormente, en presencia del fármaco, encontramos moléculas de agua en el interior de la bicapa [14, 21, 22]. El número de moléculas de agua en el interior, N_{wc} , fue calculado considerando el rango de -10 a 10Å . Estas cantidades, N_{WTI} y N_{wc} , se muestran en la tabla 3.2. Observamos que desde la condición -C, las moléculas de fármaco arrastraron, cuantitativamente, mayor cantidad de agua

al centro de la bicapa, especialmente pNRT. Además, calculamos el grado de hidratación - número de moléculas de agua en la interfase por lípido, N_{WL} - mediante

$$N_{WL} = \frac{(N_{WTI} - N_{WC})}{N_{POPC}}$$

N_{WL} también se muestra en la tabla 3.2. nNRT-W tuvo un comportamiento peculiar en relación a la hidratación de POPC. La cantidad de aguas por lípido disminuyó respecto de la bicapa de POPC pura (~2 moléculas), debido a la presencia de moléculas de nNRT en lugar de moléculas de agua, conservando el mismo valor de A_{lip} (tabla 3.1) [11]. En el otro extremo, desde la condición -C, tanto pNRT como nNRT, aumentaron notablemente la hidratación de los lípidos (~4 moléculas), concomitantemente con el aumento de A_{lip} . Los efectos de NRT-C sobre la hidratación de cabezas polares fueron similares para ambos estados de ionización.

Tabla 3.2. Hidratación de los sistemas.

Sistema	Número total de aguas (W)	N_{WTI}	N_{WC}	$N_{WL}(\text{error})$
POPC pura	4200	1498	0.5	10.0(1)
pNRT-W	5000	1716	0.7	11.4(1)
pNRT-C	5000	2184	108.9	13.8(4)
nNRT-W	5000	1251	0.8	8.3(1)
nNRT-C	5000	2057	20.5	13.6(4)

Con el fin de verificar como la hidratación afectó la polarización del sistema, calculamos el potencial electrostático del agua (figura 3.3). Observamos que el agua se despolarizó en presencia de NRT en comparación con la bicapa de POPC pura. En particular, observamos una despolarización más pronunciada para pNRT, especialmente para pNRT-C. Además, pNRT mostró un cambio notorio en el perfil de potencial para la interfase ($\pm 27\text{\AA}$), debido a cambios en la orientación del agua en esta región. El potencial observado para pNRT-C sufrió un cambio notable en $z=0\text{\AA}$, debido a la gran cantidad de agua en el interior de la bicapa. Por otro lado, en presencia de nNRT-C, observamos un potencial más plano. Para nNRT-W, observamos apenas una leve despolarización. En este caso, el número de moléculas de agua por lípido, y

probablemente también la orientación de las moléculas de agua, fue diferente a POPC pura, ya que las moléculas de agua fueron reemplazadas por moléculas de nNRT.

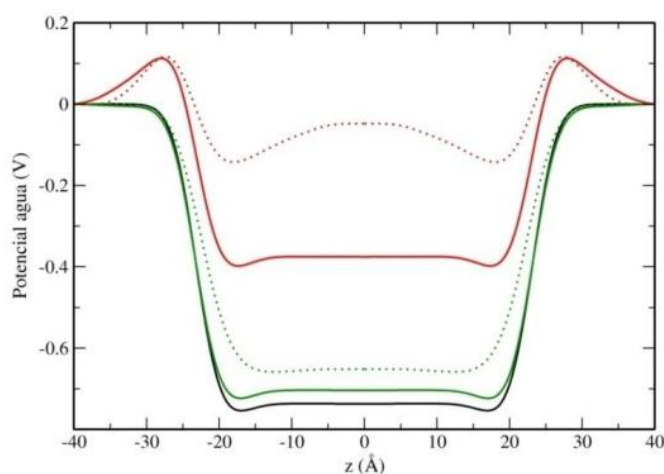


Figura 3.3. Superposición del potencial electrostático del agua para todos los sistemas. El perfil de agua para POPC pura se muestra en negro, para pNRT en rojo y nNRT en verde, condición -W (líneas llenas) y -C (líneas punteadas). $z=0\text{\AA}$ corresponde al centro de la bicapa.

La presencia del fármaco, además de modificar el perfil de densidad y la hidratación de POPC, también puede alterar la organización de la bicapa. Con la finalidad de ver analizar esta alteración, calculamos el parámetro de orden (PO) para ambas cadenas hidrocarbonadas de POPC (palmitoil, 16: 0; oleoil, 18: 1, por separado), para todos los sistemas estudiados. Mostramos los resultados en la figura 3.4. Como referencia, incluimos el PO de una bicapa de POPC pura en cuadrados negros, en buen acuerdo con los resultados de literatura [23]. Una vez más, el efecto de NRT-W sobre POPC fue poco apreciable: independientemente del estado de ionización, NRT no afectó o, a lo sumo, organizó levemente ambas cadenas. El acceso de nNRT-W a la región de los carbonos superiores de las colas hidrocarbonadas condujo a un leve aumento del PO. Para la condición -C, también encontramos efectos similares entre pNRT y nNRT: junto con la expansión lateral, y la consecuente baja densidad, la presencia del fármaco causó desorganización de las colas de POPC. Debido a la diferencia en la localización de las moléculas de NRT en la bicapa, este efecto se vio acentuado en diferentes regiones: los carbonos superiores (hasta 9) fueron más afectados por pNRT y los carbonos inferiores (desde 9-10) por nNRT. Por otro lado, la presencia de agua en el interior de la bicapa observado para pNRT-C y

nNRT-C, también afectó la movilidad de las cadenas hidrocarbonadas. La organización de las colas es el resultado de un fino equilibrio entre la expansión lateral, el empaquetamiento de los lípidos, la hidratación y la localización de los fármacos.

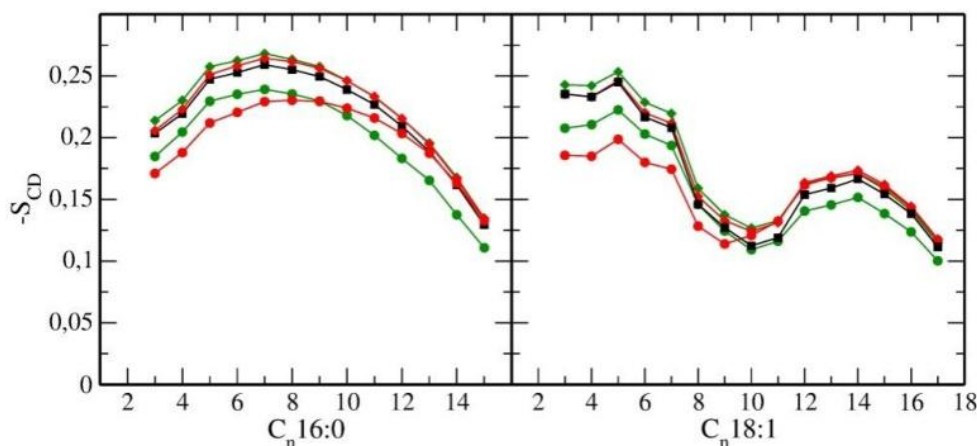


Figura 3.4. Parámetro de orden de POPC para todos los sistemas. POPC en cuadrados negros, pNRT-W en rombos rojos, pNRT-C en círculos rojos, nNRT-W en rombos verdes y nNRT-C en círculos verdes. Las líneas de unión son sólo para fines de visualización.

Para tener una idea del efecto de NRT sobre los grupos de cabeza polar, centramos nuestra atención en la distribución de los átomos de nitrógeno (N) y fósforo (P) de POPC. Calculamos el PDE para ambos átomos. En la figura 3.5, debido a la simetría, mostramos la densidad de P de una sola monocapa. La distribución de P y N se ajustó con funciones gaussianas. La densidad de N de ambas monocapas siguió la misma tendencia que P (resultados no mostrados). Encontramos diferencias sutiles, tanto en la posición en z de los máximos, como en la forma de distribución, para los cuatro sistemas. Observamos superposición de densidad para pNRT-W y nNRT-W con POPC pura. Sin embargo, para pNRT-C y nNRT-C, observamos densidades más anchas para el átomo P. En particular, para pNRT-C la distribución de P se alejó de una gaussiana. En la figura 3.5 también mostramos la posición en el eje z de los máximos -estimados por ajuste gaussiano- para todos los casos. Si bien pNRT-C y nNRT-C causaron ambos una gran expansión lateral del sistema (tabla 3.1), las cabezas polares de POPC se distribuyeron de manera diferente dentro de la bicapa (figura 3.5, izquierda: distancia P-P y P-N). Este fenómeno fue descrito previamente en la literatura para otros fármacos [20, 24].

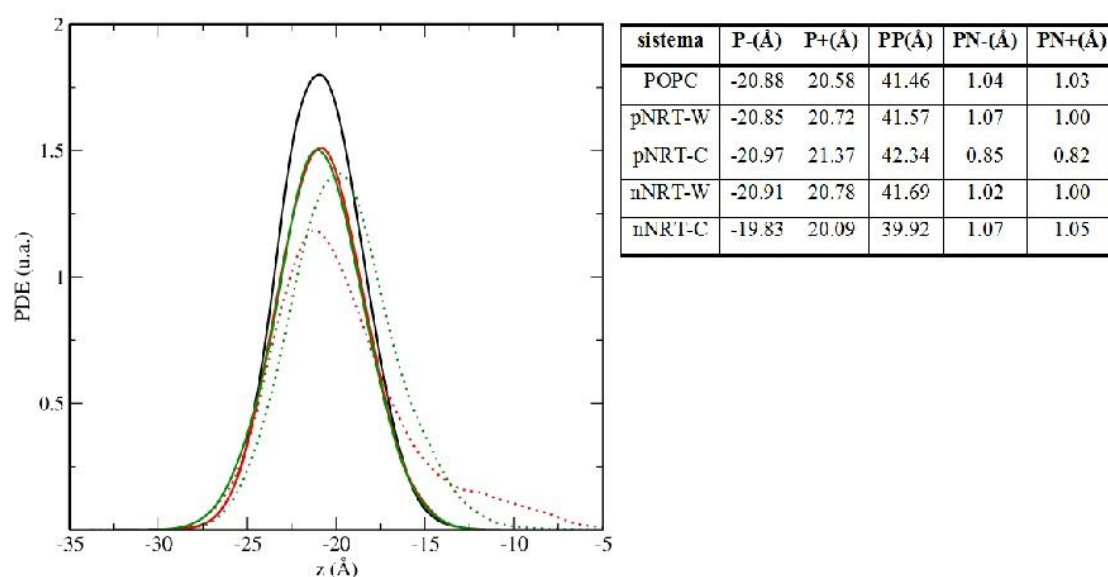


Figura 3.5. Derecha. Perfil de densidad de electrones (PDE) del átomo P (grupo fosfato, POPC) para los sistemas estudiados. La densidad de P para POPC pura se muestra en negro, pNRT en rojo, nNRT en verde, condición -W (líneas llenas) y -C (líneas punteadas). Izquierda. Valores de ajuste gaussiano para P, distancia de máximos P-P y P-N.

Como discutimos hasta el momento, desde la condición -C, pNRT y nNRT alteraron considerablemente la bicapa lipídica, debido a la presencia de un gran número de moléculas de fármaco en el ambiente hidrofóbico. En el caso de nNRT, las moléculas se distribuyeron entre la región de las colas y la interfase, pese al escaso volumen disponible en ambas regiones. Con el fin de entender la organización de nNRT en la bicapa, obtuvimos imágenes instantáneas de la configuración del sistema. En la figura 3.6 mostramos la configuración final en el eje z, así como su correspondiente vista superior.

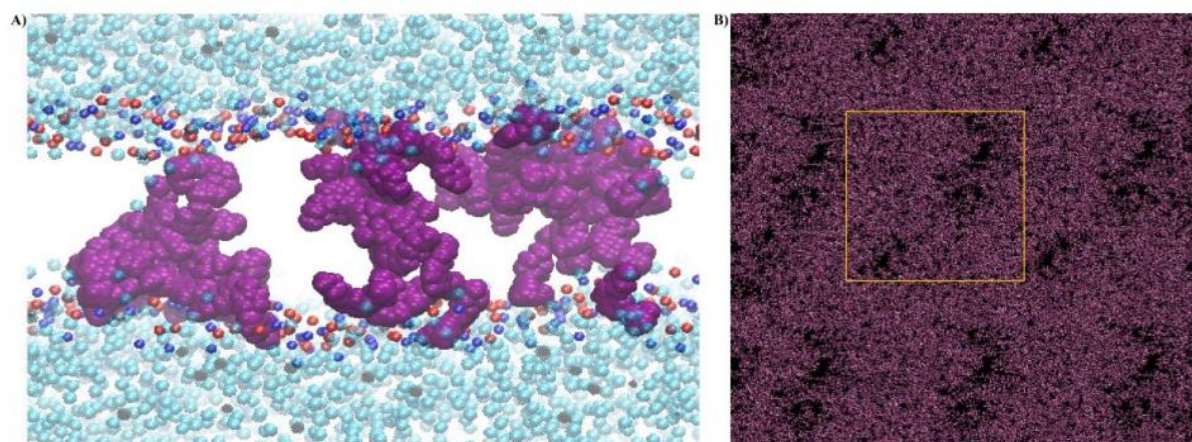


Figura 3.6. Configuración final del sistema nNRT-C. A) Vista lateral (eje z). nNRT en violeta (VDW), agua en celeste y cabezas polares de POPC en rojo (P) y azul (N). B) Vista superior (plano xy) de la bicapa de POPC (púrpura) en condiciones periódicas de contorno.

Como puede observarse, las moléculas de nNRT se agregaron entre sí en la bicapa de POPC, minimizando el contacto con las colas hidrofóbicas. Visto desde arriba (plano xy), los agregados de nNRT generaron espacios en la bicapa de POPC. Un comportamiento similar se observó para pNRT y será discutido en el próximo capítulo.

Con la finalidad de ver como se orientaron las moléculas de NRT en la bicapa, analizamos el PDE de diferentes grupos (piperidina, pirrol, benceno y sulfonamida). A partir del análisis detallado del PDE de estos grupos, observamos que, en promedio, la mayoría de ellos se superpusieron en la misma región de la bicapa y no adoptaron una orientación preferencial. Sin embargo, nNRT mostró un comportamiento peculiar, en ambas condiciones. En la figura 3.7 mostramos la distribución de los grupos mencionados, para nNRT-C y nNRT-W. En la condición -W, encontramos un alto porcentaje de moléculas en la fase acuosa, que no mostraron orientación alguna, mientras que un bajo porcentaje se orientó en la interfase. Esta pequeña fracción -compuesta en gran proporción por el grupo piperidina- mostró mayor acceso al interior hidrofóbico de la bicapa. Por su gran volumen y la falta de carga neta, el grupo piperidina de nNRT, al no anclarse en la interfase, tuvo la libertad de acceder a una región diferente. Por otra parte, para nNRT-C, el grupo sulfonamida mostró un comportamiento diferencial, quedando en una región más superficial, más expuesto a la fase acuosa. En definitiva, la falta de carga neta en nNRT hizo de la sulfonamida la región más polar de la estructura.

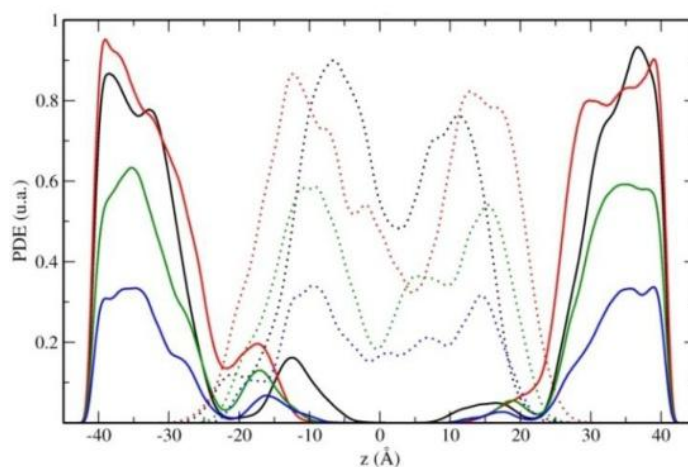


Figura 3.7. Perfil de densidad electrónica (PDE) detallado de nNRT. El grupo amino lateral en negro, pirrol en azul, benceno en verde y sulfonamida en rojo; condición -W (líneas llenas) y -C (líneas punteadas). $z=0\text{\AA}$ corresponde al centro de la bicapa.

A continuación, analizamos las principales interacciones de NRT en membranas modelo. En el caso específico de nNRT, no podemos considerar la interacción puente salino por su estado de ionización.

Para empezar, calculamos la función de distribución radial, $g_{c\pi}(r)$, para la interacción catión- π entre NRT y POPC. En la figura 3.8, observamos un pico bien definido a $\sim 4.0\text{\AA}$ para los cuatro sistemas, como discutimos previamente para moléculas similares (ver capítulos 1 y 2). Para la condición -C, el comportamiento fue independiente del estado de ionización, dado el alto número de moléculas de NRT en la interfase (nNRT-C ~ 26 y pNRT-C ~ 28). En cambio, para pNRT-W y nNRT-W observamos picos de menor intensidad, sobretudo nNRT-W, debido al bajo número de moléculas en la interfase (~ 13).

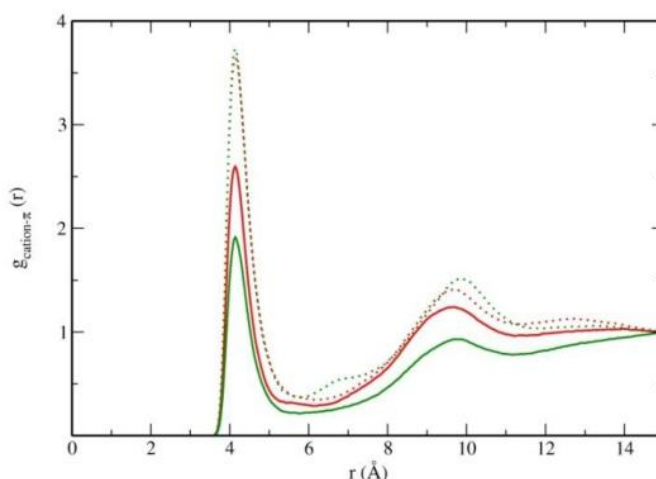


Figura 3.8. Función de distribución radial para la interacción catión- π . pNRT se muestra en rojo y nNRT en verde, condición -W (línea continua) y condición -C (línea punteada).

Calculamos el número de enlaces de hidrógeno (HB) entre diferentes pares dador-aceptor, promediados sobre el tiempo de simulación y el número de moléculas de fármaco en interfase. nNRT tiene sólo dos grupos HB dadores debido a la falta de carga neta: NH indólico y sulfonamida NH, mientras que pNRT tiene un grupo dador adicional: amino piperidina. En la figura 3.9, mostramos los HB entre NRT con fosfato y carbonilo de POPC (HB_{Op} y HB_{Oc} , respectivamente).

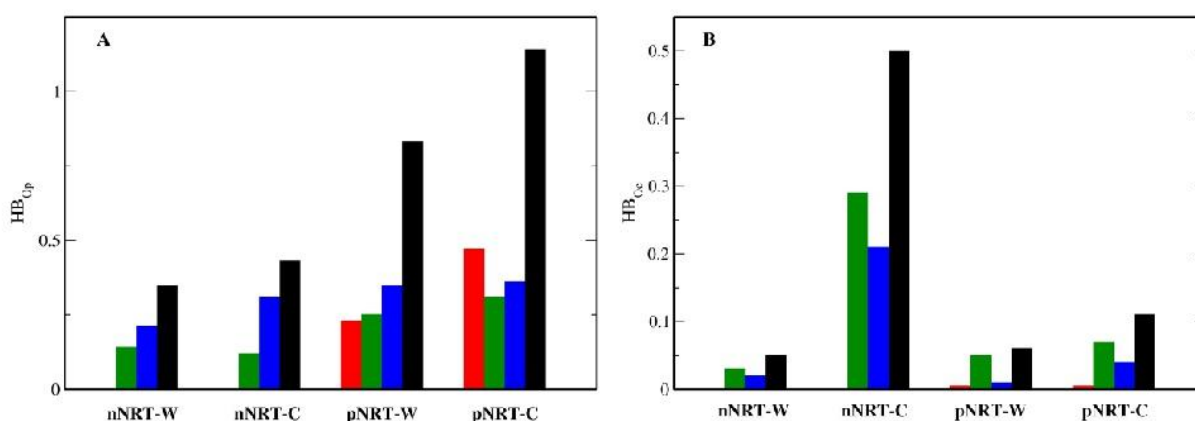


Figura 3.9. Número medio de HB por molécula de NRT en interfase con A) Op y B) Oc de POPC. Se muestran los grupos de NRT: NH lateral (rojo), NH indol (verde), NH sulfonamida (azul) y total (negro).

En la figura 3.9 observamos que NRT formó mayor número de HB_{Op} que HB_{Oc}. Para pNRT esta tendencia se explica por la presencia de carga neta, responsable de la interacción fuerte y específica en la interfase que ancló a las moléculas de fármaco localizadas en esta región. nNRT formó menor cantidad de HB_{Op} que pNRT. Por ejemplo, nNRT-C formó una cantidad equivalente de HB_{Oc} -incluso mayor que HB_{Op}-, dado el número de moléculas en una región más profunda de la bicapa. nNRT-W formó, respecto de pNRT-W, menor cantidad de HB_{Op}, pero un número comparable de HB_{Oc}, ya que mostró mayor acceso a la región hidrofóbica (figuras 3.2 y 3.7). Entre los distintos grupos amino, NH indol mostró la mayor capacidad de formar HB_{Oc} en todos los casos [25]. Los HB_{Op} en la mayoría de los sistemas se formaron preferentemente con el grupo dador NH sulfonamida, salvo para pNRT-C que lo hizo a través de NH lateral.

Por otro lado, NRT es capaz de formar HB con agua (HB_w) a través de distintos grupos dadores y aceptores en su estructura. Mostramos el número de HB_w en la figura 3.10, expresado por número total de moléculas de fármaco, ya que las moléculas de agua se distribuyeron en diferentes partes del sistema. Los HB_w para todos los sistemas mostraron un orden creciente: amino lateral < NH indol < NH sulfonamida < SO₂ sulfonamida. El grupo -SO₂ es capaz de interactuar con átomos de hidrógeno de más de una molécula de agua al mismo tiempo. Como era de esperar, el total de HB_w fue mayor para la condición -W, dado el número de moléculas de fármaco en fase acuosa. El menor número de HB_w para nNRT-C se puede explicar por la

ausencia de moléculas de fármaco en la fase acuosa, e involucró únicamente moléculas de agua responsables por la hidratación de las cabezas polares o que ingresaron a la región hidrofóbica por la presencia de moléculas de fármaco. En nNRT, el grupo sulfonamida es la región más polar de la estructura y adoptó una orientación más superficial, buscando contactos con el agua y otros grupos polares.

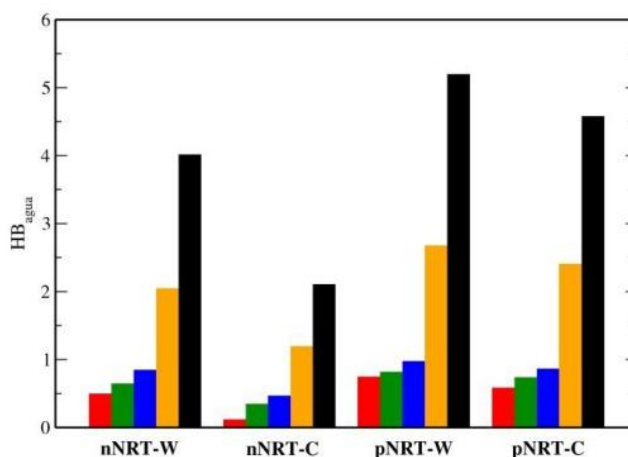


Figura 3.10. Número medio de HB por molécula de NRT con agua. Se muestran los grupos de NRT: NH lateral (rojo), NH indol (verde), NH sulfonamida (azul), SO₂ sulfonamida (amarillo) y total (negro).

CONCLUSIONES

En este capítulo, comparamos los efectos del estado de ionización y las condiciones iniciales en el comportamiento de naratriptan en membranas modelo. Vimos que la partición de naratriptan dependió de ambos factores.

Cuando las moléculas de naratriptan se colocaron inicialmente en agua, particionaron entre la fase acuosa y la interfase bicapa-agua, con escaso (nNRT) o nulo acceso (pNRT) a la región hidrofóbica. Desde esta condición, el fármaco interactuó principalmente con el agua y los grupos de cabeza polar de POPC. La difusión a través de la membrana se vio dificultada por la presencia de grupos que interaccionaron fuerte y simultáneamente con grupos polares. Particularmente, el anillo voluminoso de piperidina ejerció un efecto estérico que le impidió permanecer en la interfase, conduciendo a NRT hacia la fase acuosa o incluso a una región más hidrofóbica (nNRT).

Sin embargo, cuando naratriptan se ubicó inicialmente en la región hidrofóbica, su partición e hidratación dependieron considerablemente del estado de ionización. La falta de carga impidió a nNRT salir a la fase acuosa, favoreció su partición en el entorno hidrofóbico e hizo que el grupo sulfonamida fuera la región más polar del fármaco. En pNRT, el efecto estérico de piperidina junto con la presencia de carga neta, hicieron que el fármaco estuviera permanentemente hidratado: saliendo a la fase acuosa o favoreciendo el acceso de agua al interior de la bicapa [14]. La presencia de altas concentraciones del fármaco en el entorno hidrofóbico afectó considerablemente propiedades de membrana como el área por lípido, las dimensiones del sistema, el parámetro de orden y el estado de hidratación de los lípidos. nNRT ejerció el mayor efecto sobre el área por lípido, debido al efecto estérico del anillo piperidínico, capaz de perturbar considerablemente la organización de POPC. La intensidad de las interacciones dependió principalmente de la condición inicial: el número total de interacciones por molécula en la interfase (con POPC) fue mayor para la condición -C.

Nuestros resultados muestran que naratriptan, debido al efecto estérico del anillo piperidina, tiene dificultad para atravesar la interfase bicapa-agua, una región densa, ordenada y polar. El estado de ionización afecta el comportamiento de naratriptan, diferenciando la forma neutra de la forma protonada. En el caso de la forma neutra, la falta de carga neta genera un leve efecto sobre la polarización del agua. Además, impide a NRT interactuar y anclarse en la interfase, otorgando mayor partición en la región hidrofóbica. Cuando se encuentran en gran número en el ambiente de las colas hidrocarbonadas, las moléculas de naratriptan neutro se agregan entre sí y alteran notablemente el orden y la estructura de la bicapa.

Estamos preparando un artículo con los principales resultados de este capítulo.

REFERENCIAS

1. Connor, H., *Building on the Sumatriptan Experience: The Development of Naratriptan*. Cephalalgia, 2001. **21**(1 suppl): p. 32-34.
2. Stark, S., et al., *Naratriptan efficacy in migraineurs who respond poorly to oral sumatriptan*. Headache, 2000. **40**(7): p. 513-520.

3. Lambert, G.A., *Preclinical neuropharmacology of naratriptan*. CNS Drug Reviews, 2005. **11**(3): p. 289-316.
4. Dodick, D.W., S. Silberstein, and C.G.H. Dahlöf, *Is there a preferred triptan?* Headache, 2002. **42**(1): p. 1-7.
5. Goadsby, P.J., *The pharmacology of headache*. Progress in Neurobiology, 2000. **62**(5): p. 509-525.
6. Bigal, M.E., et al., *The triptan formulations: A critical evaluation*. Arquivos de Neuro-Psiquiatria, 2003. **61**(2 A): p. 313-320.
7. Adelman, J.U. and E.J. Lewit, *Comparative aspects of triptans in treating migraine*. Clinical Cornerstone, 2001. **4**(3): p. 53-64.
8. Cady, R., *Looking forward: The expanding utility of sumatriptan and naratriptan*. Cephalalgia, Supplement, 2001. **21**(1): p. 35-38.
9. Castro, J.L., et al., *Enhancement of Oral Absorption in Selective 5-HT_{1D} Receptor Agonists: Fluorinated 3-[3-(Piperidin-1-yl)propyl]indoles*. Journal of Medicinal Chemistry, 1998. **41**(15): p. 2667-2670.
10. Avdeef, A., et al., *pH-Metric logP 10. Determination of Liposomal Membrane-Water Partition Coefficients of Ionizable Drugs*. Pharmaceutical Research, 1998. **15**(2): p. 209-215.
11. Högberg, C.-J., A. Maliniak, and A.P. Lyubartsev, *Dynamical and structural properties of charged and uncharged lidocaine in a lipid bilayer*. Biophysical Chemistry, 2007. **125**(2-3): p. 416-424.
12. Malheiros, S.V.P., et al., *A new look at the hemolytic effect of local anesthetics, considering their real membrane/water partitioning at pH 7.4*. Biophysical Chemistry, 2004. **110**(3): p. 213-221.
13. Schreier, S., S.V.P. Malheiros, and E. de Paula, *Surface active drugs: self-association and interaction with membranes and surfactants. Physicochemical and biological aspects*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2000. **1508**(1-2): p. 210-234.
14. Boggara, M.B. and R. Krishnamoorti, *Partitioning of Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs in Lipid Membranes: A Molecular Dynamics Simulation Study*. Biophysical Journal, 2010. **98**(4): p. 586-595.
15. Boggara, M.B., M. Mihailescu, and R. Krishnamoorti, *Structural Association of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs with Lipid Membranes*. Journal of the American Chemical Society, 2012. **134**(48): p. 19669-19676.
16. Austin, R., et al., *The Thermodynamics of the Partitioning of Ionizing Molecules Between Aqueous Buffers and Phospholipid Membranes*. Pharmaceutical Research, 2005. **22**(10): p. 1649-1657.
17. Austin, R.P., A.M. Davis, and C.N. Manners, *Partitioning of ionizing molecules between aqueous buffers and phospholipid vesicles*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1995. **84**(10): p. 1180-1183.
18. Fischer, H., R. Gottschlich, and A. Seelig, *Blood-Brain Barrier Permeation: Molecular Parameters Governing Passive Diffusion*. The Journal of Membrane Biology, 1998. **165**(3): p. 201-211.
19. Paula, E.d. and S. Schreier, *Use of a novel method for determination of partition coefficients to compare the effect of local anesthetics on membrane structure*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1995. **1240**(1): p. 25-33.
20. Högberg, C.-J. and A.P. Lyubartsev, *Effect of Local Anesthetic Lidocaine on Electrostatic Properties of a Lipid Bilayer*. Biophysical Journal, 2008. **94**(2): p. 525-531.
21. Disalvo, E.A., A.M. Bouchet, and M.A. Frias, *Connected and isolated CH₂ populations in acyl chains and its relation to pockets of confined water in lipid membranes as observed by FTIR spectrometry*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2013. **1828**(8): p. 1683-1689.
22. MacCallum, J.L., W.D. Bennett, and D.P. Tieleman, *Partitioning of amino acid side chains into lipid bilayers: results from computer simulations and comparison to experiment*. The Journal of general physiology, 2007. **129**(5): p. 371-377.
23. Suits, F., M.C. Pitman, and S.E. Feller, *Molecular dynamics investigation of the structural properties of phosphatidylethanolamine lipid bilayers*. The Journal of Chemical Physics, 2005. **122**(24): p. 244714.
24. Baeuerle, H.D. and J. Seelig, *Interaction of charged and uncharged calcium channel antagonists with phospholipid membranes. Binding equilibrium, binding enthalpy, and membrane location*. Biochemistry, 1991. **30**(29): p. 7203-7211.
25. Petersen, F.N.R., M.Ø. Jensen, and C.H. Nielsen, *Interfacial Tryptophan Residues: A Role for the Cation- π Effect?* Biophysical Journal. **89**(6): p. 3985-3996.

CAPITULO 4: COMPARACION DE TRIPTANOS PROTONADOS

MOTIVACION

En la literatura se discute que NRT es más lipofílico que SMT [1, 2]. Los valores disponibles de coeficiente de partición (logP) para ambos fármacos se obtuvieron mediante el uso de predictores y experimentos de partición en el sistema *n*-octanol/agua (tabla 4.1). Los valores disponibles sugieren un limitado pasaje a través de BHE [3, 4]. Si bien hay pequeñas diferencias en los valores de logP de NRT y SMT, hasta ahora observamos que la afinidad de ambas estructuras por la membrana es muy similar, al menos para la forma predominante a pH fisiológico. Esto se debe a la naturaleza anisotrópica de la bicapa -potencial dipolar, densidad, dinámica y orden-, mientras que *n*-octanol es isotrópico y difícilmente reproduce, por ejemplo, la interacción amina-fosfato [5, 6].

Tabla 4.1. Valores disponibles de coeficiente de partición en literatura.

Fármaco	AlogP ^a	ClogP ^a	logD _{pH7.4} ^b
SMT	1.0	0.74	-1.3
NRT	1.7	0.47	-0.2

^a forma neutra, predictor [7, 8]

^b forma protonada, *n*-octanol/buffer [2, 7, 9, 10]

Las diferencias entre ambas estructuras (figura 4.1) hacen que, mediante el uso de tablas y predictores, se obtengan distintos valores de logP. Por ejemplo, NRT es más voluminoso que SMT. Tiene 7 átomos adicionales, repartidos en 3 grupos metileno extra. Algunos conforman un ciclo en el sustituyente N-metil-piperidina, menos flexible que una sustitución alifática lineal, como el grupo N-dimetil-etil-amino de SMT. Además, el grupo sulfonamida está conectado al indol por un etileno en NRT y un metileno en SMT.

Aquí nos enfocaremos en la forma protonada de ambos fármacos dada su prevalencia a pH fisiológico. Como ya discutimos para NRT, evaluaremos el comportamiento de ambos triptanos en el entorno acuoso ya que, desde allí, se establece naturalmente la interacción con la bicapa.

Sin embargo, también estudiaremos la condición inicial dentro de la membrana, considerando que NRT y/o SMT tuvieran capacidad de difundir a través de la bicapa [11] o algún mecanismo favoreciera su permeación [12].

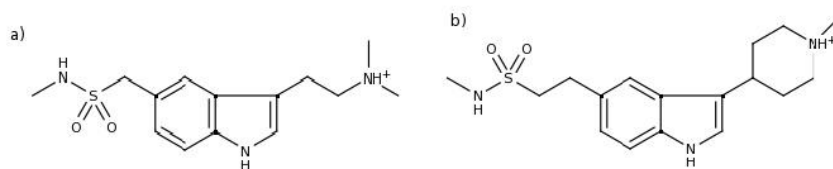


Figura 4.1. Estructuras de los fármacos protonados: a) sumatriptan (pSMT) y b) naratriptán (pNRT).

1. SIMULACIONES: TRIPTANOS EN FASE ACUOSA

En primer lugar, comparamos los resultados de dos simulaciones para cada fármaco, a dos concentraciones fármaco:POPC diferentes: 1:75 y 1:3. En esta situación, las moléculas de pNRT y pSMT fueron colocadas inicialmente en la fase acuosa (condición -W). Las simulaciones se llevaron a cabo hasta los 100ns. Para el análisis estadístico de la mayoría de las propiedades, consideramos los últimos 50ns de simulación.

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Evalúamos la distribución de los componentes del sistema por medio del perfil de densidad electrónico (PDE) normal a la bicapa ($z=0\text{\AA}$ corresponde al centro de la membrana). En la figura 4.2 mostramos el PDE para todos los casos. Las bicapas de POPC se muestran en negro, el agua en azul, pSMT en rojo y pNRT en verde. Para el caso 1:75 ampliamos 10 veces la densidad de pSMT y pNRT para mejor visualización.

Observamos que ambos triptanos se distribuyeron entre la fase acuosa y la interfase bicapa-agua, sin acceder a la región hidrofóbica. Si bien pSMT y pNRT no mostraron diferencias sustanciales en su partición, pNRT tuvo ligeramente mayor acceso a la fase acuosa. Además, pNRT-1:75, mostró una distribución heterogénea entre ambas monocapas.

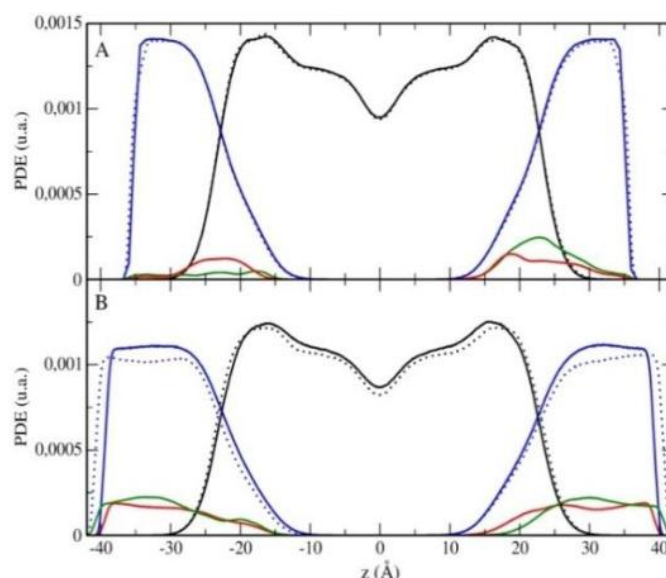


Figura 4.2. Perfil de densidad electrónica (PDE) de los diferentes sistemas. A) 1:75 (densidad de triptanos ampliada 10 veces) y B) 1:3. POPC se muestra en negro, agua en azul, pSMT en rojo y pNRT en verde; líneas continuas pSMT y líneas punteadas pNRT. $z=0\text{\AA}$ corresponde al centro de la bicapa.

Con el fin de ilustrar la distribución heterogénea de pNRT-1:75, mostramos la trayectoria del centro de masa de cada molécula individual para ambos fármacos a concentración 1:75 (figura 4.3). A diferencia del PDE, en la figura 4.3 $z=0\text{\AA}$ corresponde al centro de la fase acuosa (teniendo en cuenta las condiciones periódicas de contorno).

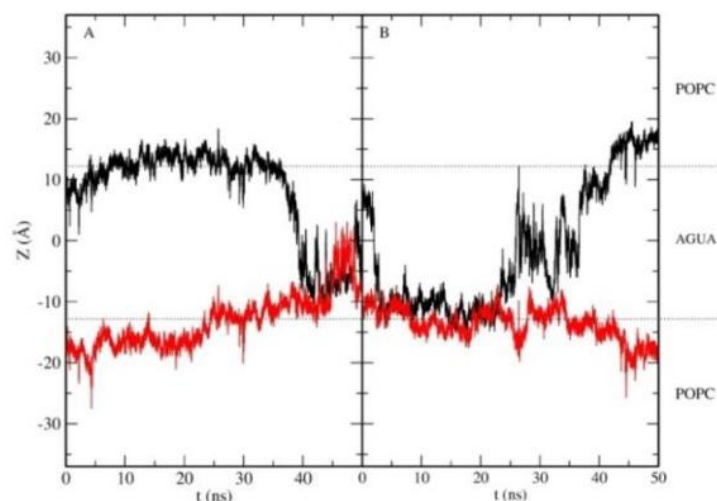


Figura 4.3. Trayectorias centradas en agua del centro de masa de triptanos a lo largo del eje z , concentración de fármaco (1:75): A) pSMT y B) pNRT. Las moléculas de ambos fármacos se representan por separado en negro y rojo.

Confirmamos que, tanto pNRT como pSMT, tuvieron acceso a la fase acuosa y cruzaron de una monocapa a la otra a través de la fase acuosa (ver líneas punteadas de referencia en negro), explicando la distribución asimétrica de pNRT. Obtuvimos resultados similares para 1:3.

Los porcentajes de pNRT en la fase acuosa a concentración 1:75 y 1:3, fueron 25% y 73%, respectivamente. Estos valores fueron considerablemente mayores que los correspondientes a pSMT (20% y 63%). La energía libre calculada para pSMT y pNRT (1:75) dio 3.4 ± 0.4 y 2.7 ± 0.4 kJ/mol, respectivamente (ver capítulo 2). A concentración 1:3, el valor de energía libre cambió de signo (pSMT: -1.4 ± 0.3 kJ/mol, y pNRT: -2.5 ± 0.3 kJ/mol), ya que los fármacos mostraron mayor afinidad por la fase acuosa que por la interfase.

Por otra parte, los efectos de ambos fármacos sobre el área por lípido no fueron significativos. Para el caso pSMT-1:3 se observó el mayor cambio: de 59.0 \AA^2 (POPC pura y casos 1:75) a 60.7 \AA^2 .

Con el fin de analizar los efectos causados por los triptanos en la polarización de la bicapa, calculamos el potencial electrostático de POPC. En la figura 4.4, mostramos los resultados para pNRT y pSMT a concentración 1:3.

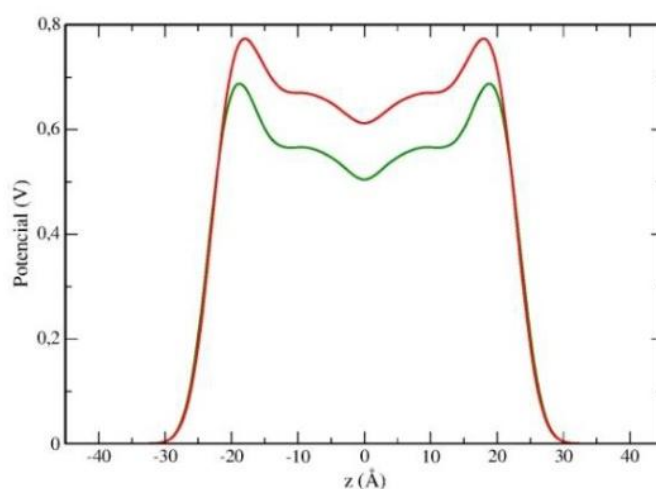


Figura 4.4. Superposición del potencial electrostático de POPC para concentración 1:3 en presencia de pSMT y pNRT, en rojo y verde, respectivamente. $z=0 \text{ \AA}$ corresponde al centro de la bicapa.

No encontramos efecto apreciable de los fármacos a baja concentración, ni de pNRT-1:3, sobre la polarización de POPC, en comparación con una bicapa pura. Sin embargo, la presencia de pSMT, provocó un aumento considerable del potencial de POPC (~ 0.10 V).

A continuación, comparamos las principales interacciones que estabilizaron a pNRT y pSMT, a ambas concentraciones. En primer lugar, calculamos la función de distribución radial, $g_{\text{cation}-\pi}(r)$,

entre el anillo indol (pSMT y pNRT) y el átomo de nitrógeno cargado de colina (POPC). En la figura 4.5 mostramos las funciones $g_{C-\pi}(r)$ calculadas para ambos triptanos a concentración 1:75 (líneas punteadas) y 1:3 (líneas continuas). Observamos un pico bien definido a $\sim 4.0\text{\AA}$ para los cuatro sistemas, en concordancia con el resto de los compuestos indólicos ya estudiados. El comportamiento fue muy similar entre ambos triptanos a cada concentración. Particularmente, la intensidad del primer pico cayó con el aumento de la concentración, debido a la mayor partición en fase acuosa.

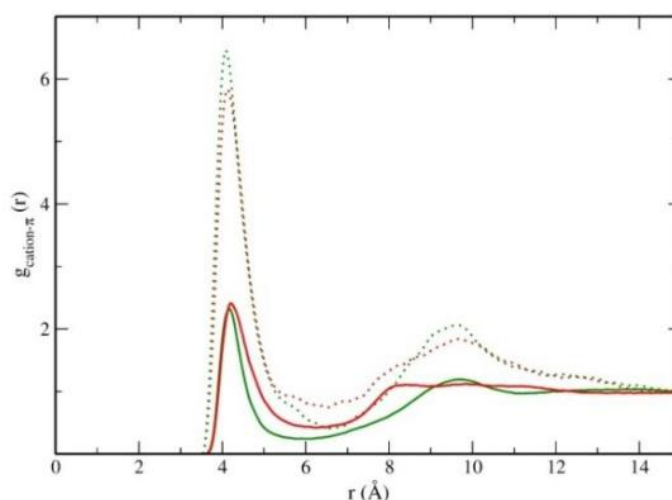


Figura 4.5. Función de distribución radial entre el anillo indólico de triptanos y el grupo colina de POPC. pSMT y pNRT en rojo y verde, respectivamente, 1:75 en líneas punteadas y 1:3 en líneas llenas.

Determinamos el número de HB entre distintos pares promediando sobre el tiempo de simulación. POPC actúa como aceptor de HB a través de los átomos Op y Oc. Calculamos el número de HB con tres grupos dadores de ambos triptanos (amino lateral, NH indol y NH sulfonamida). Observamos que la formación de HB con Oc fue considerablemente baja para todas las concentraciones. Por lo tanto, discutiremos los diferentes HB con Op (HB_{Op}). En la tabla 4.2, mostramos el número promedio de HB_{Op} para los diferentes grupos amino de los triptanos. Para facilitar la comparación, mostramos el número estimado de HB_{Op} por molécula en la interfase.

Tabla 4.2. HB_{Op} (error estadístico) para diferentes grupos amino de triptanos, por molécula en interfase.

Sistema	Amino lateral	NH indol	NH sulfonamida
	Promedio (error)	Promedio (error)	Promedio (error)
pSMT-1:75	0.769(3)	0.314(3)	0.285(2)
pNRT-1:75	0.339(2)	0.615(3)	0.485(3)
pSMT-1:3	0.463(1)	0.430(1)	0.426(1)
pNRT-1:3	0.415(1)	0.328(1)	0.605(1)

NH sulfonamida. A partir de la tabla 4.2, vimos que el número de HB_{Op} aumentó con la concentración para ambos triptanos (49% y 25% para pSMT y pNRT, respectivamente). Además, pNRT interaccionó más fuertemente con Op a través del grupo NH sulfonamida que pSMT. El grupo sulfonamida de pNRT tiene un metileno adicional en su unión al anillo indol, que aumenta su flexibilidad respecto a pSMT.

NH indol. La interacción HB_{Op} para NH indol se vio afectada en forma opuesta por la concentración para ambos triptanos. Para pNRT, el número de HB_{Op} disminuyó considerablemente con el aumento de la concentración (0.6 a 0.3), mientras que para pSMT aumentó (0.3 a 0.4). Esta interacción fue más fuerte para pNRT que para pSMT a 1:75, pero se invirtió a concentración 1:3.

Amino lateral. La interacción HB_{Op} más intensa establecida por el grupo amino lateral se observó para pSMT-1:75 (0.7). pNRT formó prácticamente la mitad de HB_{Op} que pSMT a concentración 1:75. En cambio, a concentración 1:3, ambos fármacos mostraron un comportamiento similar (~0.4HB por molécula en interfase). Este comportamiento fue contrario al observado para NH indol con Op.

Por último, investigamos la interacción puente salino entre los fármacos y la bicapa. Para ello analizamos la función de distribución radial entre el átomo N del grupo amino lateral protonado (pSMT y pNRT) y el grupo fosfato negativamente cargado (POPC), $g_{\text{amino-fosfato}}(r)$ (figura 4.6). Observamos dos picos bien definidos a ~4.0Å y ~4.7Å para pSMT, y a ~3.8Å y ~5.3Å para pNRT, como evidencia de esta interacción. Con el aumento de concentración, el primer pico se

corrió ligeramente ($\sim 0.2\text{\AA}$). Además, también se desplazaron los picos ubicados a $\sim 4.7\text{\AA}$ y $\sim 5.3\text{\AA}$. Estos corrimientos debieron esencialmente a efectos estéricos de diferente naturaleza, causados por sustituyentes diferentes en el grupo amino cargado (N-dimetil-etilo en pSMT, y N-metil-piperidina en pNRT). El entorno químico y las características estéricas contribuyeron a la fuerza de la interacción.

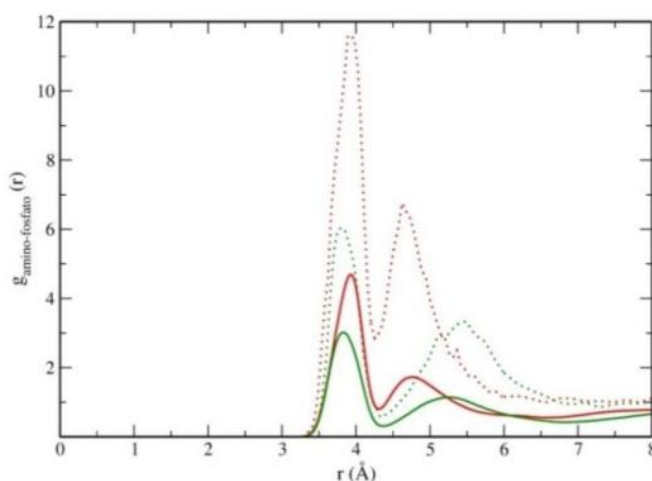


Figura 4.6. Función de distribución radial entre el grupo amino lateral (triptano) y el grupo fosfato (POPC). pSMT se muestra en rojo y pNRT en verde. Concentración 1:75 en líneas punteadas y 1:3 en líneas continuas.

En comparación, pSMT mostró mayor interacción por puente salino que pNRT. La intensidad de la interacción disminuyó con la concentración, dado el número de moléculas de triptanos en la interfase.

Las diferencias en intensidad de los picos observadas entre pSMT y pNRT pueden deberse a una diferente localización en la bicapa. Por ese motivo, analizamos el perfil de densidad de diferentes grupos en ambos triptanos (amino lateral, pirrol, benceno y sulfonamida). A concentración 1:3, vimos que los triptanos se distribuyeron entre el agua y la interfase (figura 4.2). En la interfase, la mayoría de los grupos se superpuso en la misma región, sin mostrar, en promedio, ninguna orientación preferencial. Sin embargo, observamos una diferencia notable en el perfil de densidad del amino lateral entre ambos fármacos, como mostramos en la figura 4.7. El grupo N-metil-piperidina de pNRT mostró una mayor densidad, dado su mayor volumen, y menor acceso a la interfase que el grupo N-dimetil-etil-amino de pSMT. Este comportamiento afectó

interacciones específicas con los grupos de cabeza polar de POPC, como el puente salino. Ambos triptanos fueron colocados originalmente en la fase acuosa, pero el acceso de pNRT a la bicapa estuvo más obstaculizado por la presencia del anillo alifático voluminoso.

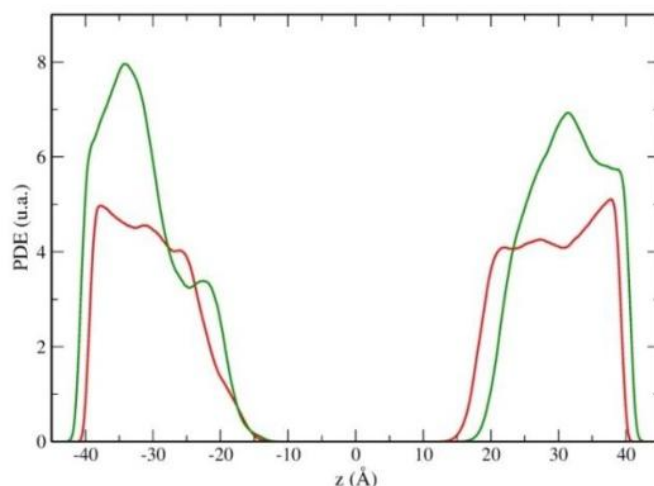


Figura 4.7. Perfil de densidad electrónica (PDE) detallado del grupo amino lateral de triptanos a concentración 1:3. pSMT y pNRT se muestran en rojo y verde, respectivamente. $z=0$ Å corresponde al centro de la bicapa.

Para resumir este trabajo de forma esquemática, en la figura 4.8 mostramos una instantánea de la bicapa de POPC conteniendo pNRT (1:3), junto con una ampliación ilustrando dos de sus principales interacciones: catión- π y puente salino.

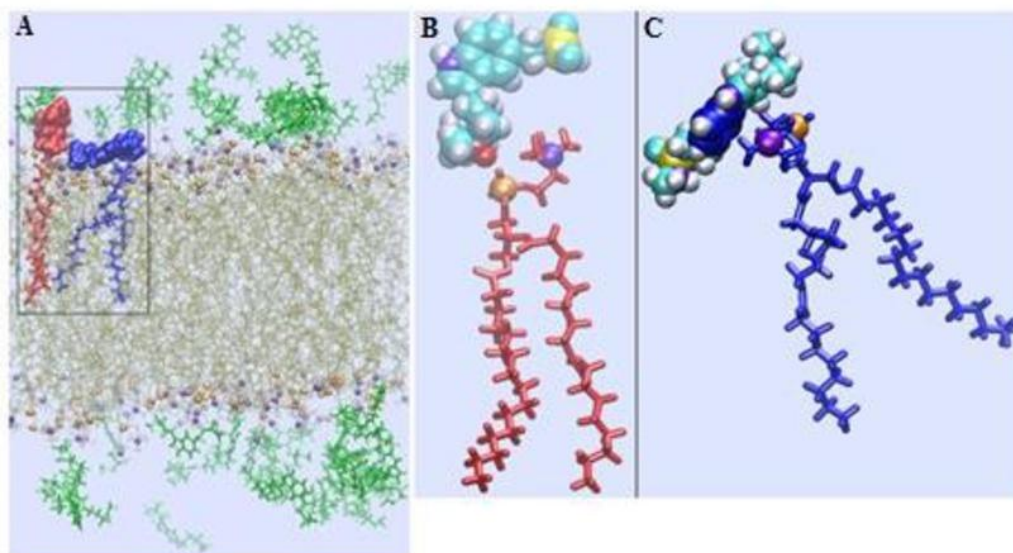


Figura 4.8. A) Imagen instantánea de la bicapa conteniendo pNRT (1:3). POPC se muestra en color marrón claro (átomos N y P como esferas violeta y naranja, respectivamente) y pNRT en verde. El agua no se muestra para mejor visualización. Se destacan dos pares POPC-pNRT en azul y rojo, respectivamente. En la ampliación de cada par ejemplificamos distintas interacciones: B) puente salino (rojo) y C) catión- π (azul). Instantáneas realizadas con *VMD* 1.8.7 [13].

2. SIMULACIONES: TRIPTANOS EN MEMBRANA

En segundo lugar, comparamos el comportamiento de pNRT y pSMT inicialmente colocados en el entorno hidrofóbico de la membrana (condición -C), a concentración fármaco:POPC 1:3. Las simulaciones se llevaron a cabo hasta 150ns.

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Para el análisis estadístico de la mayoría de las propiedades, consideramos los últimos 100ns de simulación.

En la figura 4.9 mostramos la distribución de los componentes del sistema. Desde la condición -C, pNRT y pSMT tuvieron comportamientos muy diferentes. pSMT-C convergió rápidamente a una localización interfacial, distribuyéndose entre la interfase bicapa-agua y la fase acuosa, sin permanecer en la región hidrofóbica. El comportamiento de pSMT fue prácticamente independiente de la condición inicial. En ninguno de los dos casos alteró considerablemente la densidad de POPC y agua. En cambio, como ya discutimos en el capítulo 3, pNRT-C se distribuyó a todo lo largo del eje z de la bicapa de POPC. La alteración de la densidad de POPC y agua (mayormente en el interior de la bicapa) en este caso fue considerable, debido a la presencia de pNRT en esta región. Este resultado fue muy diferente al de pNRT-W, en que el fármaco se distribuyó entre la fase acuosa y la interfase bicapa-agua.

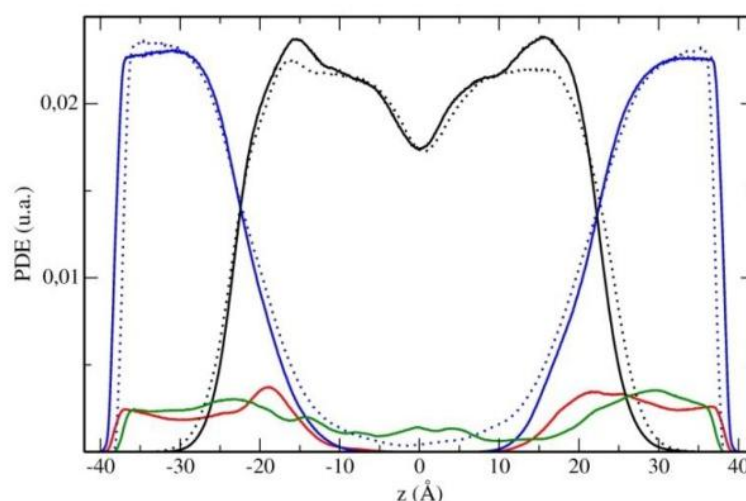


Figura 4.9. Perfil de densidad electrónica (PDE) de los sistemas pNRT-C y pSMT-C. POPC en negro, agua en azul, pSMT en rojo y pNRT en verde; líneas continuas pSMT y punteadas pNRT. $z=0\text{Å}$ corresponde al centro de la bicapa.

Dadas las diferencias en la distribución de pSMT y pNRT en la condición -C, analizamos en detalle la configuración de ambos sistemas a lo largo de la simulación. En la figura 4.10, mostramos imágenes instantáneas para los dos casos, al final de la simulación. Observamos que pNRT, a diferencia de pSMT, tuvo un alto grado de agregación, sobretudo en el interior de la bicapa. Además, en el caso de pNRT-C, una considerable cantidad de moléculas de agua ingresó a la región hidrofóbica de la bicapa y las cabezas polares de POPC cambiaron su orientación. La configuración adoptada por pNRT en esta condición se asemejó a una estructura tipo poro. Se observaron moléculas de agua asociadas al fármaco.

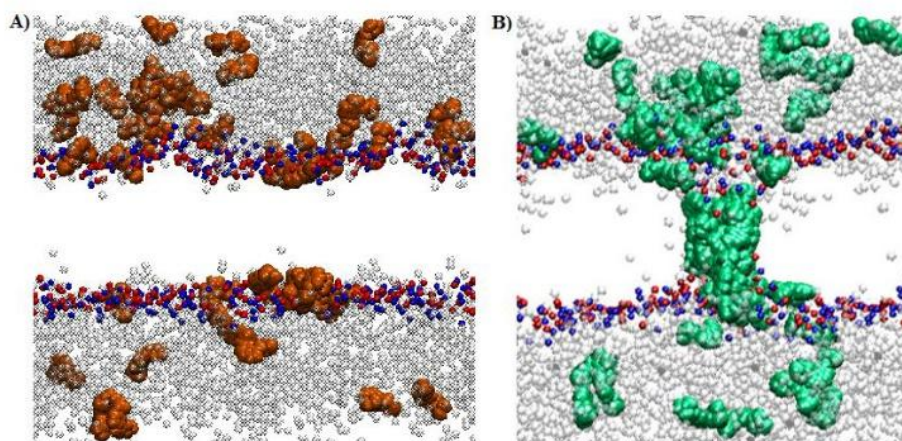


Figura 4.10. Configuración final para los sistemas A) pSMT-C y B) pNRT-C. El agua se muestra en gris, las cabezas polares de POPC en rojo (P) y azul (N), pSMT en naranja oscuro y pNRT en verde. El resto de POPC no se muestra para mejor visualización.

CONCLUSIONES

Los fármacos sumatriptan y naratriptan pertenecen a la misma familia y comparten algunas características estructurales, pero algunas diferencias entre ellos se ponen en evidencia en su partición en membranas modelo.

Como comportamiento común, desde la condición inicial en la fase acuosa, pSMT y pNRT interaccionaron esencialmente con los grupos de cabeza polar de los lípidos. Ninguno de los fármacos accedió a la región hidrofóbica de la membrana desde la fase acuosa. Las limitaciones de ambos triptanos para atravesar membranas están relacionadas con la presencia de grupos cargados y de anclaje que interactúan con el agua y las cabezas polares de los lípidos.

La intensidad de las interacciones específicas con los grupos de cabeza polar de POPC dependió de la estructura y de la concentración. Por ejemplo, la formación de puente salino entre el grupo amino lateral con el fosfato de POPC, fue más pronunciada para pSMT que para pNRT. En pNRT, el grupo piperidina impidió el acceso a la región interfacial, de alta densidad y lo desplazó a la fase acuosa.

Ambos fármacos tienen el mismo número de dadores/aceptores de enlaces de hidrógeno, pero difieren en la flexibilidad del grupo sulfonamida y los efectos estéricos del grupo amino lateral. Si bien ambos fármacos mostraron una partición muy similar cuando fueron colocados inicialmente en la fase acuosa, sumatriptan mostró una ligera preferencia por la fase de membrana. En esta condición, las diferencias entre el comportamiento de ambos fármacos fueron sutiles.

Observamos diferencias notables en el comportamiento de los fármacos protonados cuando se colocaron originalmente en el centro de la bicapa. A la misma concentración fármaco:lípido (1:3), pNRT mostró mayor partición en la fase de membrana. Además, la presencia de naratriptan en la región hidrofóbica de la membrana causó un considerable ingreso de agua. Este comportamiento no fue observado para pSMT: su partición no dependió de las condiciones iniciales.

Nuestros resultados indican que, considerando la presencia del fármaco en la fase acuosa, la partición de las formas protonadas de SMT y NRT no difiere sustancialmente. Además, SMT, en cualquier condición, muestra mayor afinidad por la interfase que NRT. Las simulaciones indican que ambos fármacos tienen diferente dinámica de partición. En el caso de localizarse en la región de las colas hidrofóbicas, SMT difundiría rápidamente hacia el exterior de la bicapa en busca de la región interfacial y la fase acuosa. En cambio, los resultados indican que NRT permanece más tiempo en la membrana, al menos durante el tiempo de simulación.

Parte de los resultados de este capítulo fueron publicados en: *Triptan partition in model membranes*. J Mol Modeling 20 (2014):2463-2471.

REFERENCIAS

1. Connor, H., *Building on the Sumatriptan Experience: The Development of Naratriptan*. *Cephalalgia*, 2001. **21**(1 suppl): p. 32-34.
2. Fox, A.W., *Comparative Tolerability of Oral 5-HT_{1B/1D} Agonists*. *Headache: The Journal of Head and Face Pain*, 2000. **40**(7): p. 521-527.
3. Kalvass, J.C., T.S. Maurer, and G.M. Pollack, *Use of Plasma and Brain Unbound Fractions to Assess the Extent of Brain Distribution of 34 Drugs: Comparison of Unbound Concentration Ratios to in Vivo P-Glycoprotein Efflux Ratios*. *Drug Metabolism and Disposition*, 2007. **35**(4): p. 660-666.
4. Tfelt-Hansen, P., *Does sumatriptan cross the blood-brain barrier in animals and man?* *The Journal of Headache and Pain*, 2010. **11**(1): p. 5-12.
5. Austin, R.P., A.M. Davis, and C.N. Manners, *Partitioning of ionizing molecules between aqueous buffers and phospholipid vesicles*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1995. **84**(10): p. 1180-1183.
6. Austin, R., et al., *The Thermodynamics of the Partitioning of Ionizing Molecules Between Aqueous Buffers and Phospholipid Membranes*. *Pharmaceutical Research*, 2005. **22**(10): p. 1649-1657.
7. Lambert, G.A., *Preclinical neuropharmacology of naratriptan*. *CNS Drug Reviews*, 2005. **11**(3): p. 289-316.
8. IUPAC, F. J., Ganellin, R. , *Analogue-based Drug Discovery*. 2006: John Wiley.
9. Pascual, J. and P. Muñoz, *Correlation between lipophilicity and triptan outcomes*. *Headache*, 2005. **45**(1): p. 3-6.
10. Evans, D.C., et al., *Eletriptan metabolism by human hepatic cyp450 enzymes and transport by human p-glycoprotein*. *Drug Metabolism and Disposition*, 2003. **31**(7): p. 861-869.
11. Fischer, H., R. Gottschlich, and A. Seelig, *Blood-brain barrier permeation: Molecular parameters governing passive diffusion*. *Journal of Membrane Biology*, 1998. **165**(3): p. 201-211.
12. Batrakova, E.V. and A.V. Kabanov, *Pluronic block copolymers: Evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers*. *Journal of Controlled Release*, 2008. **130**(2): p. 98-106.
13. Humphrey, W., A. Dalke, and K. Schulten, *VMD: Visual molecular dynamics*. *Journal of Molecular Graphics*, 1996. **14**(1): p. 33-38.

CAPITULO 5: MODELOS *COARSE GRAIN* DE SUMATRIPTAN Y POLOXÁMEROS

MOTIVACION

En esta tesis buscamos nuevas soluciones para el tratamiento farmacológico de la migraña. Para ello, proponemos la encapsulación de sumatriptan en micelas poliméricas. El estudio de sistemas de vehiculización y liberación de fármacos, desde el punto de vista computacional, implica trabajar con sistemas de gran tamaño y procesos en escalas de tiempo prolongadas [1, 2]. Para que sea accesible y factible con las herramientas computacionales disponibles, se requiere un abordaje y nivel de descripción diferentes a los que ya discutimos (simulaciones atomísticas, capítulos 1 al 4).

Particularmente, en este capítulo proponemos modelos *coarse grain* (CG) para dos compuestos de interés farmacéutico de este trabajo. Basamos el diseño y parametrización en el campo de fuerzas de Martini (MFF) [3].

En primer lugar, diseñamos un modelo CG para el fármaco sumatriptan, en su forma protonada, predominante a pH fisiológico. Basamos este modelo en el aminoácido Trp de MFF [4, 5]. En nuestro caso, ajustamos los parámetros en función de la partición de sumatriptan protonado en bicapas modelo, comparando con simulaciones a escala atomística (capítulo 2).

En segundo lugar, propusimos un modelo CG para poloxámeros. Los poloxámeros son compuestos anfífilicos utilizados ampliamente en el área biomédica y farmacéutica [6]. Estructuralmente, son co-polímeros lineales tri-bloque [7]. Están compuestos por un bloque central de poli-propilen-óxido (PPO), de carácter hidrofóbico, flanqueado por dos bloques idénticos de poli-etilen-óxido (PEO), más hidrofílicos. La cantidad de unidades EO y PO es variable y conduce a una amplia gama de propiedades y aplicaciones. Una de sus propiedades más destacadas es la micelización termo-reversible [8, 9], que los convierte en sistemas versátiles para el transporte de fármacos [10-13]. Por ejemplo, proporcionan un transporte eficaz a través de la barrera hemato-encefálica (BHE) *in vivo* e *in vitro* [14].

1. DESARROLLO DEL MODELO DE SUMATRIPTAN

Ajuste del modelo de triptofano

El campo de fuerzas *MPFF* posee un modelo para todos los aminoácidos, incluido triptófano (trp) (figura 5.1). Sin embargo, en el caso particular de los modelos para aminoácidos, al estar desarrollados para el estudio de proteínas, la representación explícita de los extremos amino y carboxilo puede requerir un ajuste adicional. Esto se debe a que el comportamiento de un aminoácido no es estrictamente equivalente cuando está en solución (zwitteriónico) o está involucrado en un enlace peptídico (péptido o proteína). Ya habíamos estudiado la forma zwitteriónica de Trp (capítulo 1), por lo que realizamos ajustes en las interacciones de pares. Obtuvimos una adecuada representación para la distribución de Trp en una bicapa de POPC, en comparación con las simulaciones atomísticas. Cabe mencionar que este ajuste fue necesario también por las diferencias entre los campos de fuerza atomísticos y *coarse grain*.

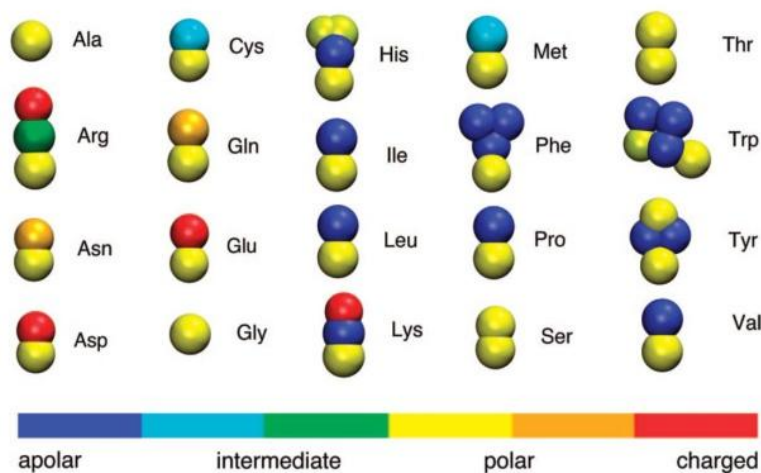


Figura 5.1. Representación de las cadenas laterales de los aminoácidos en el modelo de *MPFF* [4].

Diseño y ajuste del modelo para el fármaco sumatriptan

A continuación, desarrollamos un modelo *CG* para el fármaco sumatriptan (SMT) en su forma protonada: SHCG. En primer lugar, buscamos en la estructura grupos funcionales similares en biomoléculas. Mapeamos la molécula de SMT en bloques de construcción, de aproximadamente 4 átomos pesados (átomos diferentes de H) (figura 5.2).

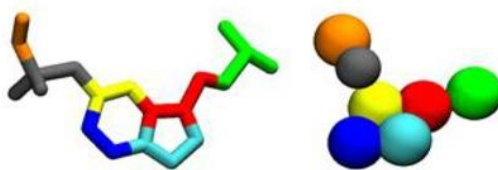


Figura 5.2. Representación atómica (sin átomos de hidrógeno explícitos) y *coarse grain* de SMT en su forma protonada. Los diferentes átomos y los correspondientes grupos se muestran en colores idénticos.

Para el esqueleto indólico de SMT usamos el modelo de Trp basado en *MPF* y ajustado para una adecuada representación de nuestros resultados por simulaciones atómicas. Para los sustituyentes sulfonamida y amino lateral, hicimos una selección de partículas más exhaustiva y detallada. Asignamos estas subestructuras químicas con las partículas del *MPF* [3] de la figura 5.3.

type	building block	examples	type	building block	examples
Q _{da}	H ₃ N ⁺ —C ₂ —OH	ethanolamine (protonated)	N _a	C ₃ =O	2-propanone
Q _d	H ₃ N ⁺ —C ₃	1-propylamine (protonated)		C—NO ₂	nitromethane
	NA ⁺ OH	sodium (hydrated)		C ₃ =N	propionitrile
Q _a	PO ₄ ⁻	phosphate		C—O—C=O	methylformate
	CL ⁻ HO	chloride (hydrated)		C ₂ HC=O	propanal
Q ₀	C ₃ N ⁺	choline	N ₀	C—O—C ₂	methoxyethane
P ₅	H ₂ N—C ₂ =O	acetamide	C ₅	C ₃ —SH	1-propanethiol
P ₄	HOH (× 4)	water		C—S—C ₂	methyl ethyl sulfide
	HO—C ₂ —OH	ethanediol	C ₄	C ₂ =C ₂	2-butyne
P ₃	HO—C ₂ =O	acetic acid		C=C—C=C	1,3-butadiene
	C—NH—C=O	methylformamide		C—X ₄	chloroform
P ₂	C ₂ —OH	ethanol	C ₃	C ₂ =C ₂	2-butene
P ₁	C ₃ —OH	1-propanol		C ₃ —X	1-chloropropane
		2-propanol			2-bromopropane
N _{da}	C ₄ —OH	1-butanol	C ₂	C ₃	propane
N _d	H ₂ N—C ₃	1-propylamine	C ₁	C ₄	butane
					isopropane

Figura 5.3. Tipos y subtipos de partículas en *MPF* y su correspondencia con diferentes grupos funcionales [3].

Creamos archivos de topología de la molécula SHCG y sus partículas. Para la asignación de los parámetros de unión, identificamos las partículas que se encuentran unidas. Medimos las distancias y ángulos de enlace en base al modelo atómico. Las interacciones de van der Waals se basaron en las partículas elegidas de la figura 5.2 y consignadas en la tabla 5.1.

Nuestro criterio de ajuste fino se basó en el comportamiento de SMT en una bicapa modelo. Como previamente teníamos resultados atómicos de SMT, utilizamos estos datos como material de referencia. Modificamos algunos tipos de partículas y potenciales de interacción en las que estaban involucradas, subiendo o bajando un nivel de atracción. Otros ajustes incluyeron la distribución de carga (tabla 5.1), equivalente a los átomos correspondientes en el modelo

atomístico. También realizamos modificaciones debido a la elección del solvente, ya que utilizamos agua polarizable *coarse grain* [15].

Tabla 5.1. Asignación de tipos de partícula, masa y carga para el modelo SHCG

Partícula	Tipo	Tabla MFF	Masa	Carga	Representación
S1	QdA	Qd	72.0	0.7	Amino lateral (dimetil-etil-amino)
S2	SC4A	sC4	54.0	0	Anillo pirrol (indol)
S3	QdA2	Qd	54.0	0.3	Grupo amino indólico (indol)
S4	SC4A	sC4	36.0	0	Anillo benceno (indol)
S5	SC5A	sC5	54.0	0	Anillo benceno (indol)
S6	P5A	P5	54.0	0	-SO ₂ (sulfonamida)
S7	P3A	P3	36.0	0	Metil-amino (sulfonamida)

En la tabla 5.1 mostramos la asignación para SHCG. Con los parámetros de estos grupos repetimos simulaciones y obtuvimos resultados adecuados al comparar con las simulaciones atomísticas del capítulo 2. En la figura 5.4 mostramos el perfil de densidad para las simulaciones *CG* comparado con las simulaciones atomísticas (*all atom*, *AA*). Además, cabe destacar que obtuvimos resultados similares cuando colocamos SHCG en el centro de la membrana (concentración 1:3). El fármaco SHCG se distribuyó entre la fase acuosa y la interfase bicapa-agua, en buen acuerdo con los resultados del capítulo 4.

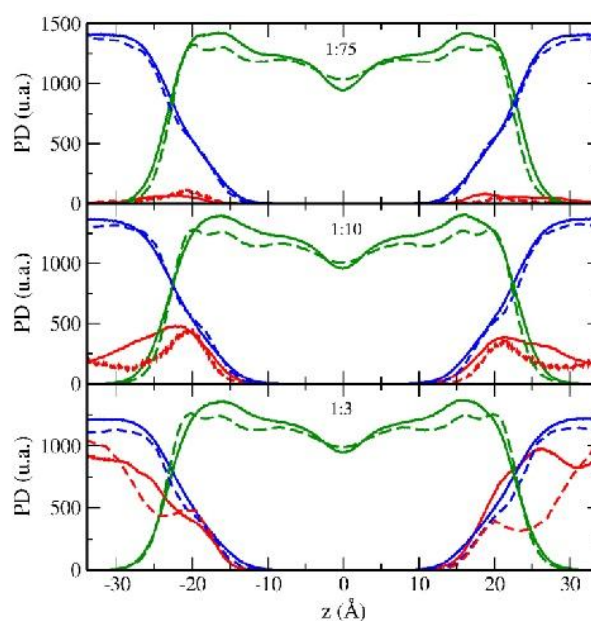


Figura 5.4. Perfil de densidad de simulaciones de SMT en una bicapa de POPC, a diferentes concentraciones y escalas, *all atom* (AA, línea llena) y *coarse grain* (CG, líneas punteadas). POPC se muestra en verde, agua en azul y SMT en rojo.

De manera análoga al capítulo 2, cuantificamos la cantidad de moléculas de SMT en distintas regiones del sistema. Para ellos dividimos el sistema en tres zonas principales: la fase acuosa *bulk*, la interfase bicapa-agua (co-existencia de cabezas polares y aguas asociadas) y la región hidrofóbica de la bicapa, donde la densidad de agua es prácticamente nula. En la figura 5.5 mostramos los resultados de esta cuantificación. Observamos buen acuerdo entre las resoluciones atomísticas y *CG* para el porcentaje de moléculas en distintas regiones, para las tres concentraciones estudiadas.

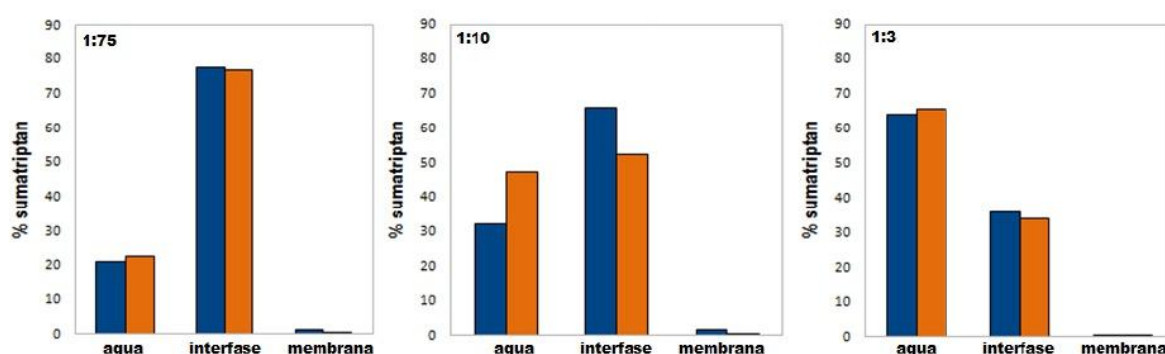


Figura 5.5. Porcentaje de moléculas de sumatriptan en diferentes regiones del sistema, a tres concentraciones. Los resultados *all atom* (AA) se muestran en azul y *coarse grain* (CG) en naranja.

2. MODELO DE POLOXAMEROS

Como ya mencionamos, los poloxámeros son capaces de auto-ensamblarse en fase acuosa formando estructuras micelares. Las micelas se forman por arriba de la concentración micelar crítica (CMC) y dependiendo de la temperatura [16] y la composición del polímero. La estructura de una cadena individual de poloxámero, llamada unímero, se muestra en la figura 5.6. Con el fin de realizar simulaciones *CG*, mapeamos cada monómero de EO y PO como un solo sitio específico, donde el átomo de oxígeno corresponde al centro de cada sitio (figura 5.6).

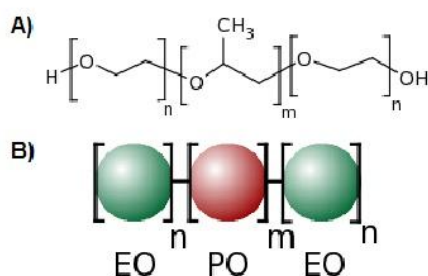


Figura 5.6. Representación de la estructura del unímero en resolución A) *all atom* (AA) y B) *coarse grain* (CG).

Nuestro modelo *CG* para poloxámeros se basó, al igual que Trp y SMT, en el modelo disponible en *MFF* para PEO. Para las partículas *CG* de EO utilizamos directamente los parámetros del *MFF*, desarrollados por Lee *et al* [17, 18] en base a resultados de simulaciones atomísticas y experimentales. Modificamos las interacciones con agua considerando el uso del agua polarizable (*PW*) [15]. Para PO, que no está incluido en *MFF*, basamos la selección del sitio en la partícula EO, de manera similar a otros trabajos [19-21]. Consideramos la naturaleza de PO, más hidrofóbica que EO [20], especialmente para las interacciones con *PW*. En la tabla 5.2 mostramos la asignación de partículas y los parámetros para el modelo *CG* de poloxámeros.

Tabla 5.2. Asignación y parametrización del modelo *CG* de poloxámeros.

Mapeo			Interacciones intermoleculares		
Partícula	Masa	carga	Par	$\sigma(\text{nm})$	$\epsilon(\text{kJ/mol})$
EO	72	0	EO-EO	0.43	3.375
PO	72	0	PO-PO	0.47	3.400
			EO-PO	0.47	2.600
			EO-PW	0.43	3.375
			PO-PW	0.47	1.800
Interacciones intramoleculares					
Unión	distancia (nm)	$K_a(\text{kJ/mol.nm}^2)$	Ángulo	(°)	$K_a(\text{kJ/mol.rad}^2)$
EO-EO	0.33	17000	EO-EO-EO	130	50
PO-PO	0.33	17000	PO-PO-PO	130	50
EO-PO	0.33	17000	EO-PO-PO*	130	50

*equivalente a EO-EO-PO

Auto-ensamblaje de F127 en solución acuosa

En primer lugar, evaluamos la capacidad de F127 (EO=200, PO=65) de auto-ensamblarse en solución acuosa [1]. F127 es uno de los poloxámeros más utilizados y estudiados [22] y su tendencia a agregarse está bien establecida. F127 forma estructuras micelares por encima de su CMC (0,25% w/v y 0,06% w/v, a 25°C y 37°C en agua, respectivamente) [23]. En este contexto, llevamos a cabo simulaciones de F127 en fase acuosa en una concentración un orden de magnitud por encima de su CMC.

Empezamos nuestra simulación de una caja de agua (~100.000 sitios *PW*). Progresivamente, fuimos añadiendo moléculas de F127 hasta alcanzar los 100 números. A partir de esta configuración aleatoria, realizamos la simulación para un sistema de grandes dimensiones (más de 300.000 partículas) y prolongada (~700ns). En la figura 5.7 mostramos imágenes instantáneas que ilustran dos momentos diferentes de la simulación. Podemos ver en esta figura, la tendencia de F127 para formar estructuras tipo micela. En particular, durante los últimos 400ns se formaron dos estructuras: una micela grande de 93 moléculas de F127 (bastante esférica) y un arreglo de siete moléculas de F127, formando una estructura tipo micelar.

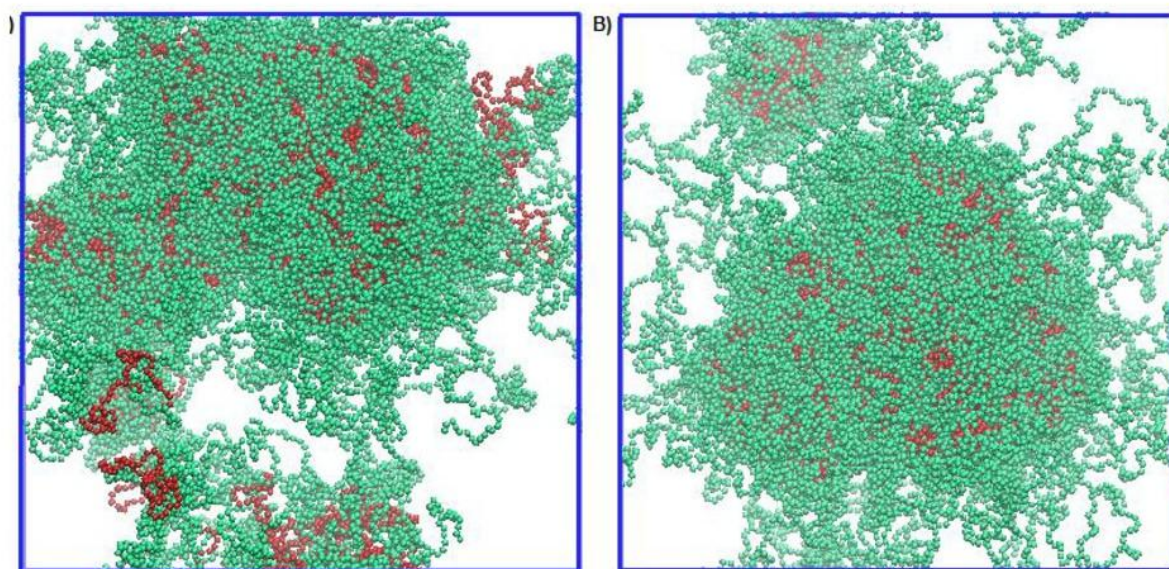


Figura 5.7. Imágenes instantáneas de la agregación de F127 en solución acuosa: A) 200ns y B) 630ns. Los bloques PEO se muestran en verde y PPO en rojo. El agua no se muestra para facilitar la visualización.

Con el fin de tener una idea de la estructura interna de la micela grande, calculamos el R_g (figura 5.8) para los bloques de PPO y PEO. Para PPO observamos un R_g pequeño (~5.2nm), formando un núcleo hidrofóbico compacto. Por otro lado, los bloques de PEO mostraron un valor de R_g mayor (~7.5nm), compatible con la corona hidrofílica externa de la micela. La estimación del tamaño de la micela estuvo en buen acuerdo con el tamaño medido experimentalmente de micelas de F127 (diámetro a partir de 10nm, 25nm en promedio a 37°C) [24].

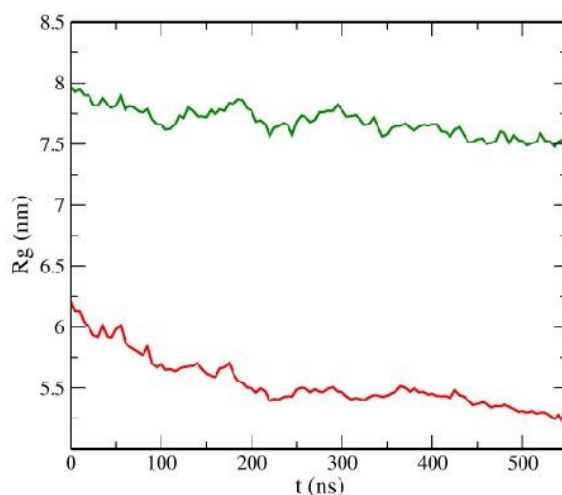


Figura 5.8. Radio de giro (R_g) de los bloques PEO (verde) y PPO (rojo) durante la simulación.

La formación de la estructura tipo micela en estas condiciones de simulación, refuerza la aptitud de nuestro modelo para estudiar algunas propiedades de F127, tales como la micelización a determinadas temperaturas y concentraciones.

Estructura pre-ensamblada de F127 en solución acuosa

En este caso, nuestra simulación partió de una conformación de moléculas de F127 organizadas representando una estructura micelar (figura 5.9). La cantidad de moléculas de F127 y de agua fue idéntica a la simulación aleatoria de F127. En este caso, las moléculas de F127 se colocaron en la caja de simulación de manera que las cadenas PPO de distintas moléculas estuvieran en contacto entre sí formando un núcleo compacto. Las cadenas de PEO de distintas moléculas adyacentes formaban una corona externa. Finalmente agregamos agua a esta conformación para estudiar su comportamiento.

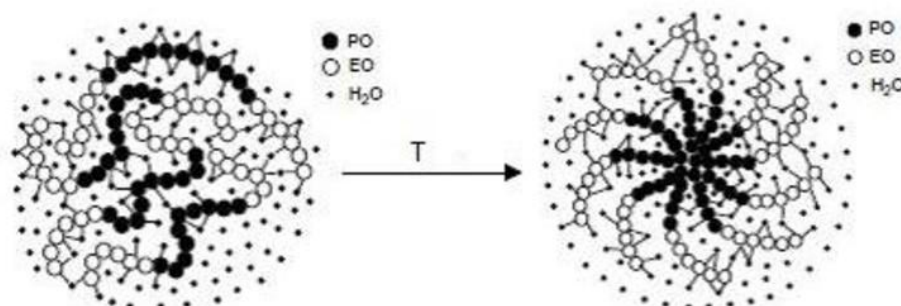


Figura 5.9. Arreglo de moléculas de poloxámeros en solución acuosa [25].

Evalúamos el comportamiento de la conformación pre-ensamblada de F127 mediante el análisis de la densidad radial. En la figura 5.10 mostramos la distribución radial de los distintos componentes del sistema. Observamos que los bloques de PPO adoptaron una conformación compacta central. Alrededor de PPO, los bloques de PEO mantuvieron una distribución más superficial y extendida, en contacto con agua. En el interior del sistema observamos una escasa densidad de agua. Es importante mencionar que esta densidad podría parecer elevada dado que el radio es pequeño.

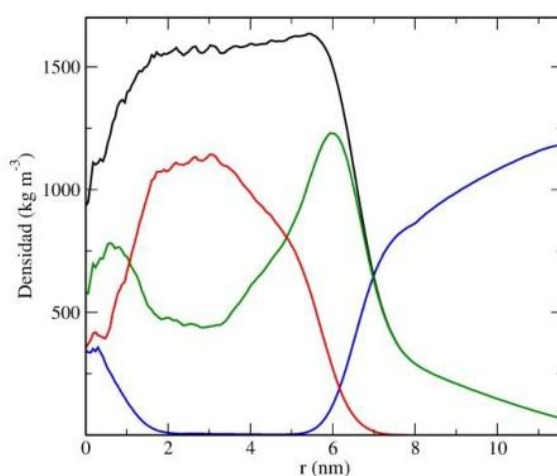


Figura 5.10. Densidad radial de los componentes del sistema micelar. En azul se muestra el agua, en negro F127, en rojo PO y en verde EO.

Evalúamos la presencia de agua en el interior de la estructura micelar calculando la densidad en forma de mapas. En la figura 5.11 mostramos la densidad del agua para el sistema pre-ensamblado de F127.

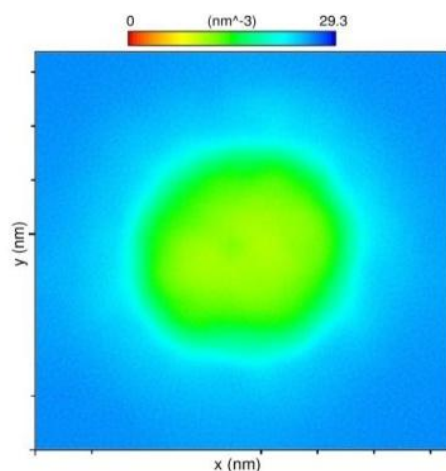


Figura 5.11. Mapa de densidad de agua en el sistema micelar. En la parte superior se muestra la escala de colores.

Observamos que la densidad de agua fue mayor en el exterior de la micela, cayendo gradualmente hacia el interior. En la zona central hubo un muy ligero aumento de densidad de agua, apenas perceptible.

Interacción de sumatriptan con F127 en solución acuosa

Los resultados obtenidos para la conformación aleatoria y la conformación pre-ensamblada de F127, indican que el polímero forma una estructura apropiada para la vehiculización de fármacos [26]. En este sentido, estudiamos la encapsulación de sumatriptan en micelas de F127. Evaluamos dos condiciones iniciales diferentes: colocamos el fármaco en la fase externa (SHCG-fuera) de la estructura micelar pre-ensamblada, o en el interior, en contacto con el núcleo PPO (SHCG-dentro). En ambos casos trabajamos con una concentración elevada de fármaco:F127 (3:1).

En la figura 5.12 mostramos imágenes instantáneas de los sistemas en ambas condiciones, tras ~500ns de simulación. Como podemos observar a simple vista, ambos sistemas tienen un aspecto similar: el fármaco particionó entre la fase acuosa y la estructura micelar.

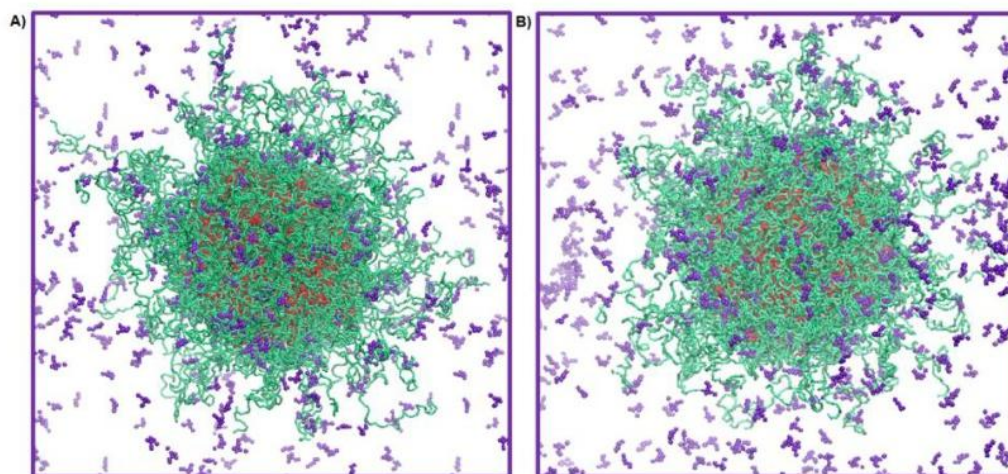


Figura 5.12. Imágenes instantáneas de micelas de F127 pre-ensambladas conteniendo: A) SHCG-afuera y B) SHCG-adentro. PEO se muestra en verde, PPO en rojo y SHCG en violeta. El agua no se muestra para facilitar la visualización.

Con el fin de hacer un análisis cuantitativo de la distribución de los componentes del sistema, en la figura 5.13 mostramos la densidad radial para ambas condiciones. Observamos que, en ambos casos, la presencia de SHCG no afectó de manera considerable la conformación de F127 y se

conservó la organización micelar. Por ejemplo, se mantuvo la estructura central, compuesta mayormente por PPO, y la corona externa de PEO, en contacto con agua. Para ambos casos se observó presencia de agua en el interior de la micela, al igual que para los sistemas en ausencia de fármaco. Si bien la distribución de SHCG varió con las diferentes condiciones, el fármaco mostró afinidad por la interfase PEO-agua en ambos casos: la densidad del fármaco se superpuso en esta región. Este resultado estuvo en buen acuerdo con Oshiro *et al* [12, 24], quienes observaron la presencia de sumatriptan en la corona de micelas poliméricas y el espacio intermicelar en estructuras supramoleculares tipo hidrogel. Para SHCG-fuera, el fármaco adoptó únicamente una distribución interfacial. En cambio, para SHCG-dentro, el fármaco se distribuyó de manera bimodal. Observamos la presencia de SHCG tanto en la interfase PEO-agua como en el interior de la micela, en la zona central.

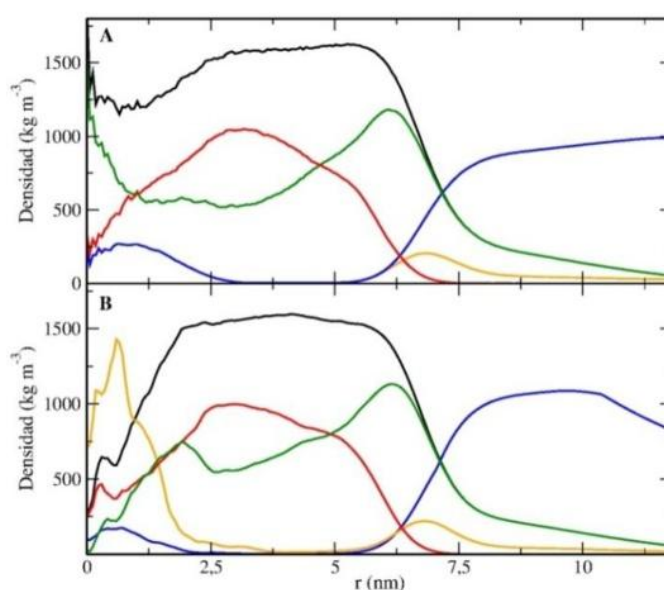


Figura 5.13. Densidad radial de los componentes del sistema micelar en presencia de SHCG desde A) afuera y B) adentro. En azul se muestra el agua, en negro F127, en rojo PO, en verde EO y en naranja SHCG (multiplicado 3 veces).

En la figura 5.14 mostramos la organización de SHCG en el sistema micelar para ambas condiciones. Esta figura ilustra el comportamiento marcadamente diferente de SHCG con la condición inicial. Estas diferentes configuraciones podrían alcanzarse variando la forma de preparación o incorporación del fármaco a la micela. En el caso SHCG-afuera (incorporado a la micela preformada), el fármaco se distribuyó en forma de anillo: mayormente en la corona

externa de la micela y de manera considerablemente homogénea. Cierta densidad de fármaco pudo observarse también en fase acuosa y, en menor medida, en el interior de la micela. En cambio, para SHCG-adentro (formación de la micela en presencia del fármaco), observamos una densidad notablemente elevada de fármaco en el núcleo del sistema micelar (~13 moléculas de SHCG en un radio de 2nm). También encontramos moléculas de fármaco en la corona.

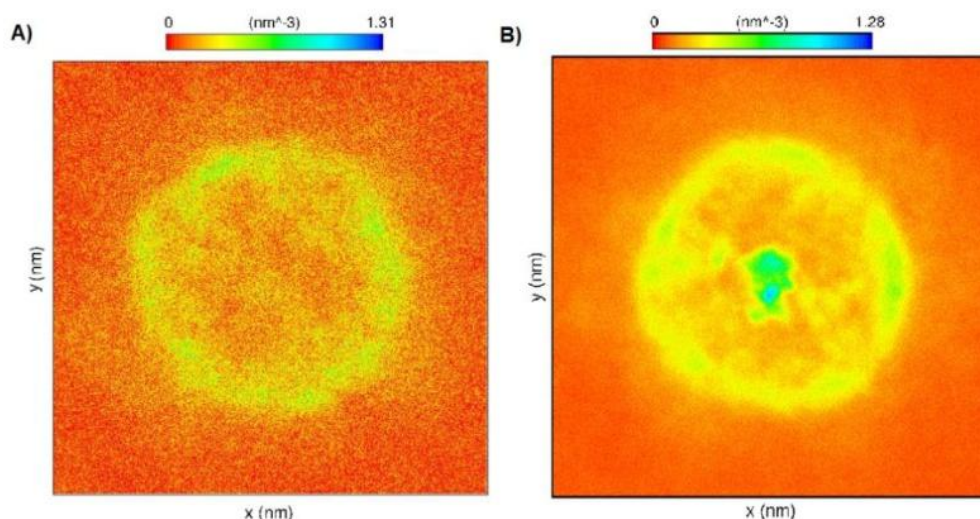


Figura 5.14. Mapa de densidad de SHCG en el sistema micelar desde A) afuera y B) adentro. En la parte superior se muestra la escala de colores.

CONCLUSIONES

Obtuvimos dos modelos *CG* precisos para estudiar el comportamiento de moléculas anfifílicas en diferentes entornos. A partir del modelo desarrollado para sumatriptan, observamos la partición del fármaco entre la interfase bicapa-agua y la fase acuosa, a diferentes concentraciones. Este resultado estuvo cuali y cuantitativamente en buen acuerdo con simulaciones atomísticas previas (capítulo 2).

El modelo *CG* de poloxámeros permitió estudiar la agregación de los co-polímeros en solución acuosa, en condiciones similares a ensayos experimentales. La formación de micelas poliméricas pudo observarse desde dos conformaciones iniciales diferentes. Por un lado, nuestro modelo mostró la capacidad de F127 de auto-agregarse en una estructura tipo micelar. Además, la micela pre-ensamblada mostró ser estable durante la simulación. Las estructuras micelares obtenidas consistieron esencialmente en un núcleo, predominantemente formado por PPO, rodeado de una

corona externa de PEO. El tamaño de las estructuras simuladas estuvo dentro del rango de las micelas obtenidas experimentalmente. Observamos cierta cantidad de agua en el interior de la micela, debido a la naturaleza parcialmente hidrofóbica de PPO. PO conserva cierto grado de polaridad debido a la presencia del átomo de oxígeno [27]. La presencia de agua en el interior de la micela está en buen acuerdo con otros trabajos en la literatura [25, 28, 29], y podría disminuir, o incluso desaparecer, a mayores temperaturas.

En líneas generales, los modelos propuestos permitieron estudiar la dinámica del proceso de agregación de poloxámeros y podrían ayudar en el desarrollo de formulaciones y sistemas de administración de fármacos. Todas las micelas estudiadas resultaron estables y parecen ser sistemas adecuados para la vehiculización de fármacos. Su carga y preparación podría ser modificada en función de las características del fármaco y del mecanismo de liberación deseado.

En particular, nuestros resultados demuestran que es posible encapsular sumatriptan -en su forma de ionización fisiológicamente relevante- en la estructura micelar. La presencia de sumatriptan no alteró la organización de la micela ni la presencia de agua en su interior. La distribución del fármaco en el sistema dependió de las condiciones en que fue agregado, indicando que los sistemas de liberación podrían ser preparados de diferentes maneras. Las dos formas de preparación estudiadas serían útiles para la administración de sumatriptan, considerando que, una vez administradas las micelas, podría formarse un hidrogel localmente, por acción de la temperatura corporal.

Estamos preparando un artículo con los principales resultados de este capítulo.

REFERENCIAS

1. Klein, M.L. and W. Shinoda, *Large-scale molecular dynamics simulations of self-assembling systems*. *Science*, 2008. **321**(5890): p. 798-800.
2. Müller-Plathe, F., *Coarse-Graining in Polymer Simulation: From the Atomistic to the Mesoscopic Scale and Back*. *ChemPhysChem*, 2002. **3**(9): p. 754-769.
3. Marrink, S.J., et al., *The MARTINI Force Field: Coarse Grained Model for Biomolecular Simulations*. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2007. **111**(27): p. 7812-7824.
4. Monticelli, L., et al., *The MARTINI Coarse-Grained Force Field: Extension to Proteins*. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 2008. **4**(5): p. 819-834.
5. de Jong, D.H., et al., *Improved Parameters for the Martini Coarse-Grained Protein Force Field*. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 2013. **9**(1): p. 687-697.

6. Jeong, B., S.W. Kim, and Y.H. Bae, *Thermosensitive sol–gel reversible hydrogels*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002. **54**(1): p. 37-51.
7. Bahadur, P., et al., *Effect of inorganic salts on the micellar behaviour of ethylene oxide-propylene oxide block copolymers in aqueous solution*. *Colloid and Polymer Science*, 1993. **271**(7): p. 657-667.
8. Li, L., et al., *Thermoreversible micellization and gelation of a blend of pluronic polymers*. *Polymer*, 2008. **49**(7): p. 1952-1960.
9. Lau, B.K., et al., *Micellization to gelation of a triblock copolymer in water: thermoreversibility and scaling*. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 2004. **42**(10): p. 2014-2025.
10. Kabanov, A.V., E.V. Batrakova, and V.Y. Alakhov, *Pluronic® block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery*. *Journal of controlled release*, 2002. **82**(2): p. 189-212.
11. Alakhov, V., et al., *Block copolymeric biotransport carriers as versatile vehicles for drug delivery*. *Expert opinion on biological therapy*, 2001. **1**(4): p. 583-602.
12. Oshiro, A., et al., *Pluronics F-127/L-81 Binary Hydrogels as Drug-Delivery Systems: Influence of Physicochemical Aspects on Release Kinetics and Cytotoxicity*. *Langmuir*, 2014. **30**(45): p. 13689-13698.
13. Kabanov, A.V., et al., *A new class of drug carriers: micelles of poly (oxyethylene)-poly (oxypropylene) block copolymers as microcontainers for drug targeting from blood in brain*. *Journal of Controlled Release*, 1992. **22**(2): p. 141-157.
14. Batrakova, E.V., et al., *Mechanism of pluronic effect on P-glycoprotein efflux system in blood-brain barrier: contributions of energy depletion and membrane fluidization*. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2001. **299**(2): p. 483-493.
15. Yesylevskyy, S.O., et al., *Polarizable water model for the coarse-grained MARTINI force field*. *PLoS Comput Biol*, 2010. **6**(6): p. e1000810.
16. Su, Y.-l., J. Wang, and H.-z. Liu, *FTIR spectroscopic investigation of effects of temperature and concentration on PEO-PPO-PEO block copolymer properties in aqueous solutions*. *Macromolecules*, 2002. **35**(16): p. 6426-6431.
17. Lee, H., et al., *A coarse-grained model for polyethylene oxide and polyethylene glycol: conformation and hydrodynamics*. *The journal of physical chemistry B*, 2009. **113**(40): p. 13186-13194.
18. Lee, H. and R.W. Pastor, *Coarse-grained model for PEGylated lipids: effect of PEGylation on the size and shape of self-assembled structures*. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2011. **115**(24): p. 7830-7837.
19. Srinivas, G., D.E. Discher, and M.L. Klein, *Self-assembly and properties of diblock copolymers by coarse-grain molecular dynamics*. *Nature materials*, 2004. **3**(9): p. 638-644.
20. Hatakeyama, M. and R. Faller, *Coarse-grained simulations of ABA amphiphilic triblock copolymer solutions in thin films*. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2007. **9**(33): p. 4662-4672.
21. Bedrov, D., G.D. Smith, and J. Yoon, *Structure and interactions in micellar solutions: molecular simulations of pluronic L64 aqueous solutions*. *Langmuir*, 2007. **23**(24): p. 12032-12041.
22. Anand, U. and S. Mukherjee, *Microheterogeneity and Microviscosity of F127 Micelle: The Counter Effects of Urea and Temperature*. *Langmuir*, 2014. **30**(4): p. 1012-1021.
23. Cuestas, M.L., et al., *Lactosylated poly (ethylene oxide)–poly (propylene oxide) block copolymers for potential active targeting: synthesis and physicochemical and self-aggregation characterization*. *Journal of nanoparticle research*, 2013. **15**(1): p. 1-21.
24. Allison, O., *PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SISTEMAS CARREADORES PARA LIBERAÇÃO MODIFICADA DE SUCCINATO DE SUMATRIPTANO DESTINADO AO TRATAMENTO DA MIGRÂNEA*. UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOSISTEMAS, 2013.
25. Chen, S., et al., *Thermodynamic analysis of micellization in PEO–PPO–PEO block copolymer solutions from the hydrogen bonding point of view*. *Molecular Simulation*, 2006. **32**(5): p. 409-418.
26. Rodrigues, T., et al., *Poloxamers as Drug-Delivery Systems: Physicochemical, Pharmaceutical, and Toxicological Aspects*. *Nanotoxicology - Materials, Methodologies, and Assessments.*, edited by Nelson Durán; Silvia S. Guterres; Oswaldo L. Alves; Springer., 2014.
27. Erukova, V.Y., et al., *Effect of ethylene oxide and propylene oxide block copolymers on the permeability of bilayer lipid membranes to small solutes including doxorubicin*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 2000. **1468**(1–2): p. 73-86.
28. Goldmints, I., et al., *Small-Angle Neutron Scattering Study of PEO–PPO–PEO Micelle Structure in the Unimer-to-Micelle Transition Region*. *Langmuir*, 1997. **13**(14): p. 3659-3664.
29. Almgren, M., W. Brown, and S. Hvidt, *Self-aggregation and phase behavior of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) block copolymers in aqueous solution*. *Colloid and Polymer Science*, 1995. **273**(1): p. 2-15.

CAPITULO 6: INTERACCIÓN DE CO-POLÍMEROS CON MEMBRANAS MODELO

MOTIVACION

Los poloxámeros son materiales ampliamente utilizados en el campo farmacéutico, gracias a su naturaleza anfifílica y sus propiedades termo-sensibles [1]. Al menos diez poloxámeros diferentes están aprobados por la agencia regulatoria norteamericana (*Food and Drug Administration, FDA*) para su uso en productos farmacéuticos [2, 3]. Pueden ser usados como excipientes en sistemas de liberación [4], por ejemplo, en formulaciones liposomales conteniendo fármacos anticancerosos, con el fin de obtener liberación controlada por temperatura [5, 6]. También se usan solos, o combinados con otros co-polímeros, como nano-transportadores por su micelización y gelación termo-reversibles [7].

Por otro lado, se sugiere que los poloxámeros tienen la capacidad de favorecer la permeación de fármacos a través de membranas, por ejemplo, en la BHE [8-11]. El o los mecanismos subyacentes no están completamente dilucidados [12], pero implican la interacción del poloxámero con la membrana lipídica [13]. Los mecanismos propuestos incluyen: formación de poros o canales transientes, acción como nano-translocadores [12], fluidización de la bicapa [10, 13], aumento del transporte vesicular [10, 14] e inhibición de bombas de eflujo [11, 15, 16].

Además, los poloxámeros sensibilizan células multi-resistentes (*multidrug resistant, MDR*), aumentando la citotoxicidad de fármacos antineoplásicos [11, 17] y mejorando la terapia en pacientes con cáncer y otras enfermedades [18]. El efecto inhibitorio sobre bombas extrusoras de fármacos *ABC (ATP binding cassette)* –sobre-expresadas en el fenotipo *MDR* [19]- fue atribuido a la interacción de los unímeros con membranas lipídicas [16, 20]. La inhibición de bombas como la glicoproteína P (P-gp) [21], podría ser crucial para el transporte, no sólo de fármacos antineoplásicos, sino también de triptanos, como por ejemplo eletriptan [22, 23].

La comprensión de las bases moleculares de la interacción poloxámero-bicapa lipídica puede ayudar en la elección de la composición de co-polímeros para distintos propósitos, incluyendo el aumento de la permeación de fármacos y/o la inhibición de bombas *ABC*.

1. SIMULACIONES DE POLOXÁMEROS

En este capítulo investigamos, mediante simulaciones de DM a escala *CG*, la interacción de unímeros F127 y co-polímeros de menor peso molecular, con bicapas lipídicas modelo. Hasta donde sabemos, en la literatura no hay trabajos reportados describiendo la interacción de F127 con bicapas lipídicas mediante simulaciones.

Los sistemas simulados consisten en una bicapa lipídica pre-ensamblada de 1000 moléculas de POPC (500 en cada monocapa), hidratadas por 20000 sitios de agua polarizable (*PW*).

Los unímeros se incorporaron en dos condiciones iniciales diferentes: en la región interfacial bicapa-agua (.I) y en el centro de la bicapa (.C) (figura 6.1).

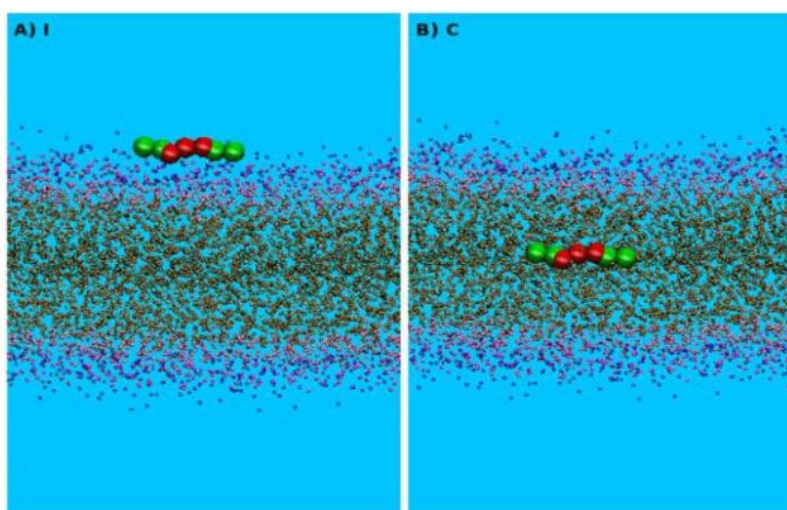


Figura 6.1. Esquema representativo de las configuraciones iniciales de simulación. El unímero fue colocado inicialmente en A) la interfase bicapa-agua (I) y B) el centro de la bicapa (C). El unímero se muestra en rojo (PPO) y verde (PEO), el agua en celeste, la bicapa en ocre y las cabezas polares en magenta (fosfato) y azul (colina).

Estudiamos F127 y otros tres co-polímeros. Elegimos F38, P85 y L64, porque fueron estudiados en diferentes bicapas lipídicas [24]. En la tabla 6.1 mostramos algunas de las características fisicoquímicas de los co-polímeros estudiados.

Tabla 6.1. Propiedades físico-químicas de los co-polímeros estudiados: peso molecular (PM), balance hidrofílico-lipofílico (BHL), porcentaje de EO y número total de EO y PO.

Co-polímero	Peso Molecular (Da)	BHL *	% EO	#EO	#PO
F127	12600	22	70	200	65
F38	4700	25	80	76	17
P85	4600	16	50	52	40
L64	2900	15	40	26	30

* BHL es un indicador de la tendencia de partición entre fase apolar y polar para compuestos con actividad surfactante.

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Con el fin de tener una visión general cualitativa del comportamiento de cada co-polímero, en la figura 6.2 mostramos instantáneas para cada sistema: L64, P85, F38 y F127, dentro de una bicapa lipídica de POPC, en las condiciones .I y .C, a 1 μ s de simulación.

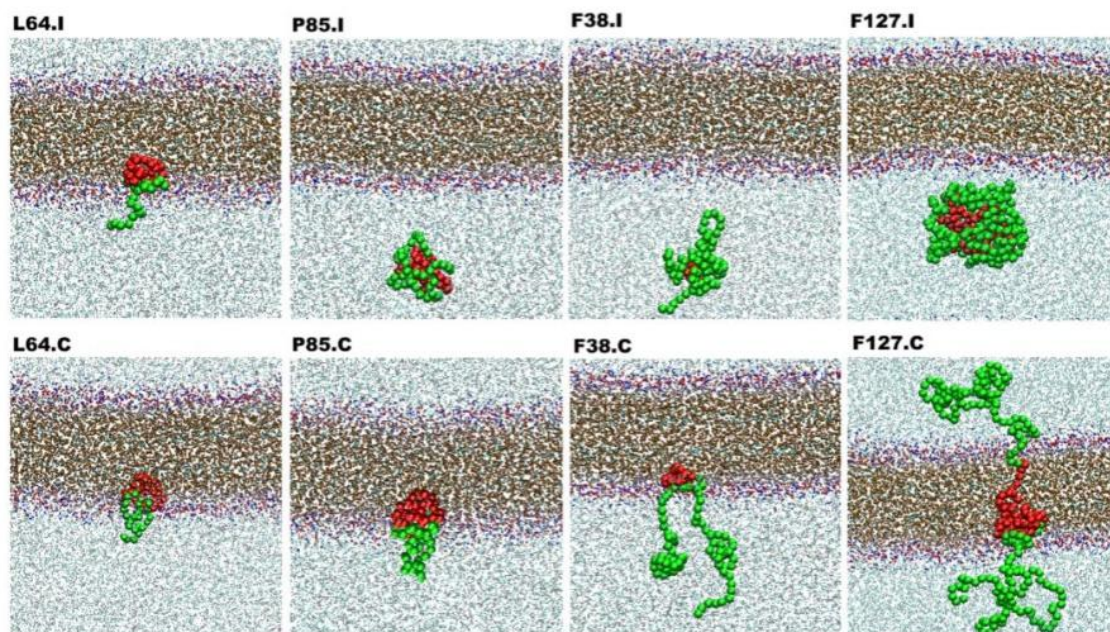


Figura 6.2. Imágenes instantáneas finales (1 μ s) de los sistemas estudiados. Los números se muestran en rojo (PPO) y verde (PEO), el agua en celeste, la bicapa en ocre y las cabezas polares en magenta (fosfato) y azul (colina).

A la izquierda de la figura 6.2, mostramos instantáneas para L64, un co-polímero corto de BHL intermedio. Observamos resultados similares para las condiciones .I y .C. L64 se encontró esencialmente en la interfase bicapa-agua, el bloque PPO se ancló en la interfase (próximo al glicerol) y los bloques de PEO se expusieron a la fase acuosa, sin diferenciarse entre ellos. L64 adoptó una conformación compacta y mostró alto grado de interacción con los grupos polares interfaciales.

Comparando las instantáneas de P85 con las de L64, notamos que, aun teniendo valores de BHL similares (ver tabla 6.1), obtuvimos diferentes resultados cualitativos para ambos. Es decir, P85 mostró un comportamiento dependiente de las condiciones iniciales. Desde la condición .I, P85 migró a la fase acuosa y adoptó una conformación compacta, en la cual el núcleo de PPO fue rodeado por PEO. Por otro lado, el resultado desde la condición .C fue muy similar a L64: el bloque PPO se ancló en la región hidrofóbica exponiendo las colas PEO a la fase acuosa.

Los resultados de F38, como los de P85, dependieron fuertemente de las condiciones iniciales. F38 colapsó a una conformación compacta (.I) o quedó anclado en la bicapa (.C). F127 también mostró una fuerte dependencia con las condiciones iniciales. Para la condición .I, el unímero colapsó a una conformación compacta, en que las colas de PEO recubrieron el núcleo de PPO. A diferencia con los otros poloxámeros, a partir de la condición .C, F127 adoptó una conformación transmembrana. El bloque PPO se extendió a lo largo de la bicapa (de los metilos terminales al glicerol) y las colas de PEO quedaron expuestas a ambos lados en la fase acuosa.

Como primera aproximación, obtuvimos un panorama general del comportamiento de F127 y co-polímeros más cortos en la bicapa lipídica mediante el análisis de las instantáneas. Con esta información en mente, cuantificamos algunas propiedades que describen este comportamiento. Con el fin de evaluar la distribución de los polímeros dentro de la bicapa, calculamos el perfil de densidad de masa (PDM) en el eje z anisotrópico, promediado en los últimos 500ns de la simulación. En la figura 6.3 mostramos los PDM del co-polímero total (en negro) y sus bloques PPO (rojo) y PEO (verde), un unímero en cada cuadrante. Señalamos las diferentes regiones de la bicapa en la figura como referencia. Los PDM están centrados ($z=0\text{\AA}$) en la fase acuosa entre las bicapas.

Los resultados del PDM reforzaron la discusión anterior. El comportamiento de L64 fue independiente de las condiciones iniciales, reflejándose en la superposición total de los perfiles de las condiciones .I y .C. El bloque de PPO se ancló en la bicapa y los bloques de PEO se solvataron en la fase acuosa.

Por otra parte, encontramos que desde la condición inicial .I, tres de los cuatro unímeros -P85, F38 y F127- migraron hacia la fase acuosa adoptando una conformación compacta. Para estos casos, la conformación adoptada consistió en un núcleo de PPO (hidrofóbico) rodeado por una capa de PEO solvatada por agua. P85 en la condición .I representó un caso límite dada su composición (52 unidades de EO y 40 de PO), ya que los bloques de PEO apenas lograron cubrir el núcleo de PPO. Por el contrario, las colas de PEO de L64 no son lo suficientemente largas como para cubrir el volumen del bloque de PPO, mostrando un comportamiento diferente.

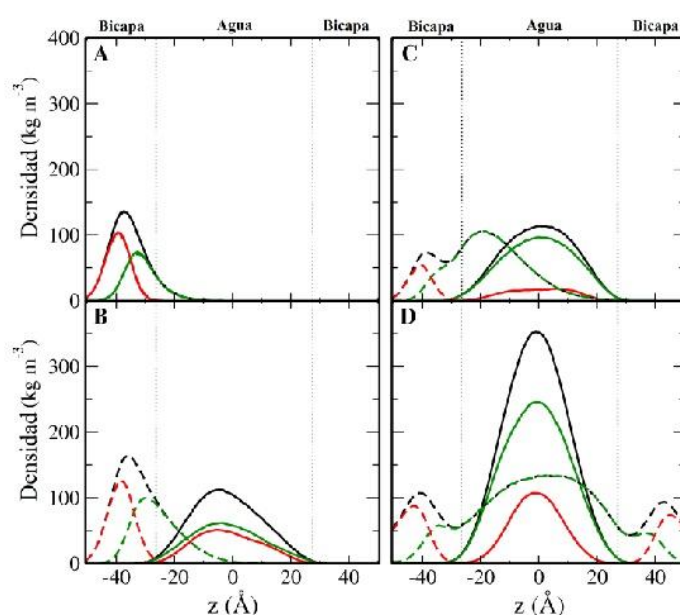


Figura 6.3. Perfil de densidad de los unímeros: A) L64, B) P85, C) F38 y D) F127. En negro se muestra la densidad del unímero, rojo PPO y verde PEO; las líneas llenas corresponden a la condición inicial .I y las punteadas a .C. $z=0\text{\AA}$ corresponde al centro de la fase acuosa.

A partir de la condición inicial .C, observamos interacción de todos los co-polímeros estudiados con la bicapa. Para P85 y F38 vimos resultados similares a L64: el unímero sólo se encontró en un lado de la bicapa. El bloque de PPO se insertó en la fase lipídica mientras que los bloques de PEO quedaron expuestos a una región más polar, del mismo lado de la bicapa. F127 mostró un comportamiento diferente: su distribución no se superpuso en las condiciones .I y .C. Cuando F127 fue colocado inicialmente en la bicapa (condición .C, línea punteada), PPO adoptó una localización restringida en la región hidrofóbica de la membrana, sin acceso a la región acuosa. Los bloques de PEO se extendieron en toda la región acuosa y, en menor medida, en la región

interfacial de la bicapa, atravesando el largo de la bicapa. De esta manera, F127 atravesó el espesor de la bicapa.

Se puede obtener más información sobre la conformación de los co-polímeros en diferentes entornos mediante el análisis del radio de giro (R_g) y la distancia extremo-extremo (Dee). Calculamos la evolución temporal de R_g y Dee para los cuatro unímeros y construimos histogramas a partir de ellos (figura 6.4). L64, el poloxámero más corto de los estudiados aquí, mostró un pico a $\sim 9\text{\AA}$ para R_g y a $\sim 19\text{\AA}$ para Dee . Los histogramas de las dos condiciones iniciales se superpusieron perfectamente, indicando un muestreo adecuado. Como mencionamos anteriormente, desde la condición .I, tres de los unímeros adoptaron una conformación compacta. A partir de los histogramas de R_g y Dee para estos casos, observamos que P85 mostró la distribución más pequeña y estrecha, incluso más que F38 (similar peso molecular, tabla 6.1). Las colas de PEO de F38 y F127 fueron lo suficientemente largas para cubrir los núcleos de PPO. De esta manera, los bloques de PEO tuvieron mayor libertad para moverse en el agua, originando mayores fluctuaciones de R_g y Dee .

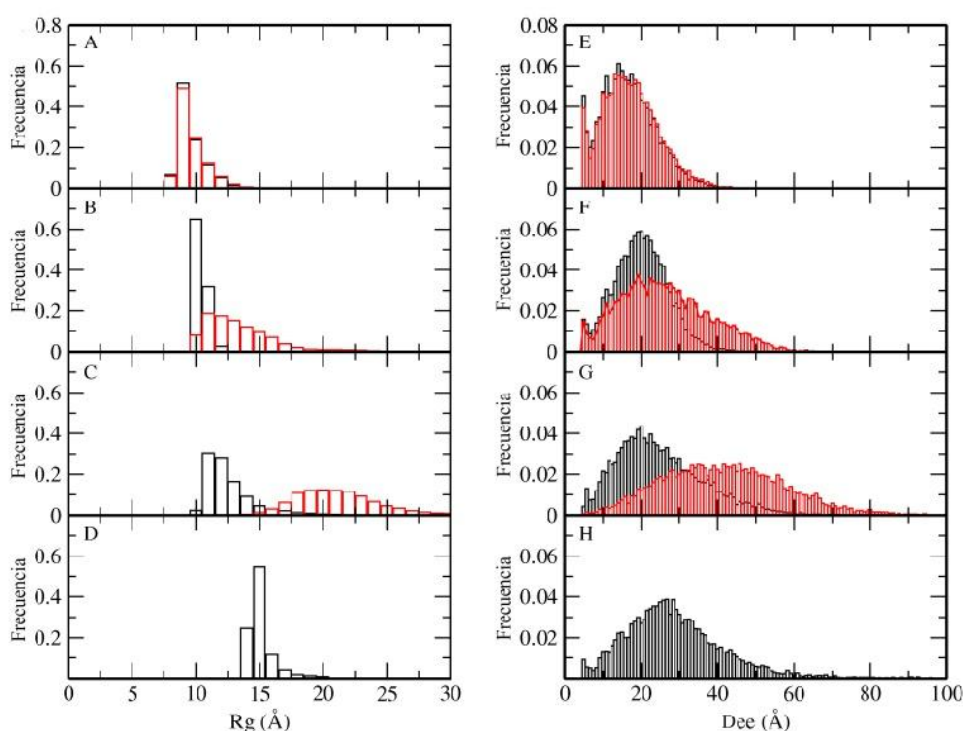


Figura 6.4. Histogramas de radio de giro (A a D) y distancia extremo-extremo (E a H) de los unímeros. A-E) L64, B-F) P85, C-G) F38 y D-H) F127. Las barras negras corresponden a la condición inicial .I y las rojas a .C.

Por otro lado, cuando los unímeros se colocaron inicialmente en la membrana, PPO quedó anclado en la región hidrofóbica y las colas PEO fueron solvatadas en agua. Los histogramas de Dee y Rg ilustraron este comportamiento. Rg y Dee aumentaron con la longitud de PEO y se comportaron de manera independiente con la longitud de PPO. Los resultados de F127 siguieron la misma tendencia (resultados no mostrados).

Nuestra discusión puso en evidencia la capacidad de los co-polímeros de adoptar dos posibles conformaciones en la bicapa lipídica -en *forma de U* y transmembrana-, que ya han sido propuestas previamente en la literatura [24-26]. Liang *et al* [25] señalaron que existen dos posibles métodos para incorporar co-polímeros en liposomas que podrían llevar a estas dos diferentes conformaciones. En particular, Hezaveh *et al* [24] encontraron una conformación transmembrana preferencial para P85 en bicapas de DMPC. Sin embargo, sus simulaciones se llevaron a cabo en condiciones diferentes.

Entre los co-polímeros cortos aquí estudiados, sólo P85 tiene una longitud de PPO compatible con una conformación transmembrana en POPC: se requiere una longitud mínima de 40 unidades de PO para extenderse y atravesar la bicapa lipídica [25, 27]. En este sentido, llevamos a cabo una simulación adicional de P85 en POPC a partir de la conformación transmembrana. Se encontró que esta conformación fue estable en el tiempo de simulación (1 μ s).

Sin embargo, el enorme unímero F127 cumple sobradamente los requisitos de longitud de PPO para atravesar la membrana, como se muestra a partir de nuestros resultados. Con el fin de tener un panorama completo del comportamiento de F127 en la bicapa de POPC, realizamos una simulación adicional a partir de una conformación en *forma de U* dentro de la membrana. La simulación mostró que esta conformación fue estable durante el tiempo de simulación (1 μ s). No se encontraron diferencias apreciables de energía total que sugieran preferencia por una de las dos conformaciones -*forma de U* o transmembrana-. En la figura 6.5 mostramos dos instantáneas de este caso.

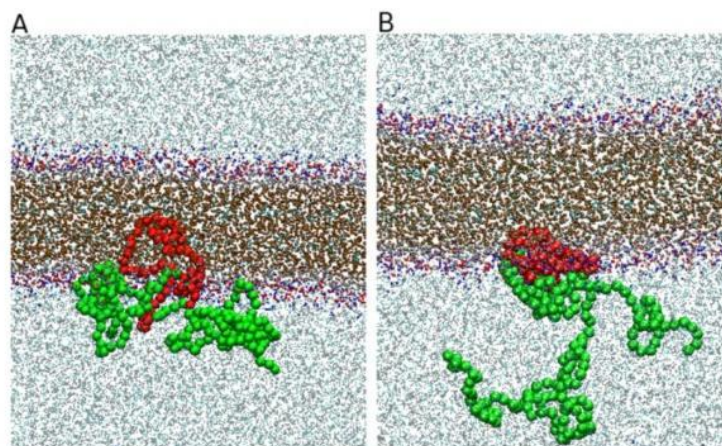


Figura 6.5. Imágenes instantáneas A) inicial y B) final (1 μ s) de F127 en la conformación U. F127 se muestra en rojo (PPO) y verde (PEO), el agua en celeste, la bicapa en ocre y las cabezas polares en magenta (fosfato) y azul (colina).

En la figura 6.6 comparamos el PDM para la conformaciones en *forma de U* y transmembrana de F127. Podemos ver que para la *forma de U*, el bloque de PPO se encontró esencialmente en la interfase bicapa-agua, en estrecho contacto con el grupo glicerol de POPC. Mientras que los bloques de PEO se extendieron desde la interfase -cerca de los grupos colina y fosfato- a la fase acuosa. El comportamiento encontrado para PPO en este caso pudo atribuirse a la fuerte interacción y dinámica de los bloques de PEO en agua.

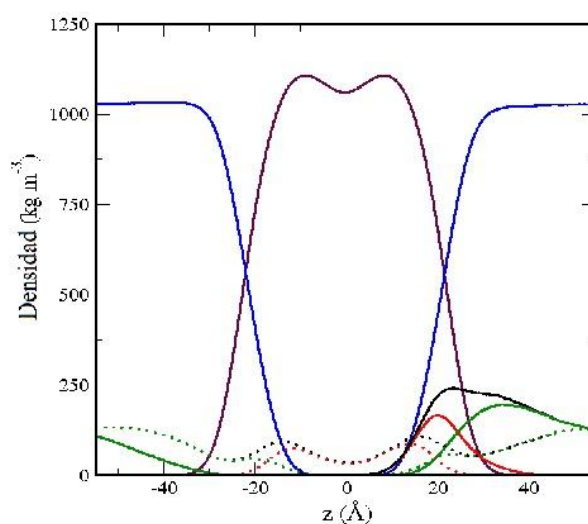


Figura 6.6. Perfil de densidad de F127. En negro se muestra el unimero, rojo PPO y verde PEO, azul agua y violeta POPC. Las líneas llenas corresponden a la conformación en *forma de U* y las punteadas a la transmembrana. $z=0\text{\AA}$ corresponde al centro de la membrana.

Para evaluar cómo se vio afectada la membrana modelo por la presencia de los co-polímeros, comparamos diferentes propiedades, tales como el área por lípido, el espesor de la bicapa, el

parámetro de orden de las colas lipídicas y la orientación de las cabezas polares. Para ninguna de estas propiedades observamos diferencias apreciables en comparación con una bicapa de POPC pura. Hezaveh *et al* informaron cambios en el espesor de la membrana en una membrana más pequeña de DMPC, en diferentes condiciones [24].

2. SIMULACIONES CON SUMATRIPTAN. RESULTADOS PRELIMINARES

En capítulos anteriores observamos, mediante simulaciones atomísticas y *CG*, que nuestro fármaco de interés, sumatriptan, mostró un fuerte anclaje en la región interfacial de bicapas de POPC. Además, vimos que es posible encapsular SHCG en micelas poliméricas. A partir de estos resultados, nos preguntamos cómo puede verse afectado el comportamiento de SHCG en bicapas de POPC por la presencia de unímeros. Para responder a esta pregunta realizamos simulaciones *CG* en distintas condiciones. Como primera aproximación, buscamos ver si la perturbación de la membrana por la incorporación de un co-polímero anfifílico, modifica la partición de SHCG en la bicapa. Específicamente, evaluamos el efecto de F127 y P85, dos co-polímeros cuya conformación transmembrana mostró ser estable durante la simulación.

A priori, evaluamos efectos como la concentración del unímero (P85) y la condición inicial del fármaco (fuera o dentro de la bicapa: condición .W y .C, respectivamente). En la figura 6.7 mostramos los perfiles de densidad de SHCG y P85 en diferentes condiciones. En presencia de P85, SHCG particionó entre la interfase bicapa-agua y la fase acuosa. Este resultado está en buen acuerdo con las simulaciones de los capítulos 2, 4 y 5 (en ausencia de co-polímero). A baja concentración de P85, tanto la densidad de P85 como la de SHCG se superpusieron perfectamente en las condiciones .W y .C. Sin embargo, en presencia de más de un unímero de P85, observamos sutiles diferencias en la distribución del fármaco entre ambas condiciones. Estas diferencias se acentuaron a medida que aumentó la concentración de P85. Observamos un comportamiento similar para P85. A alta concentración (5 y 10 unímeros), la localización inicial de SHCG afectó la distribución de P85.

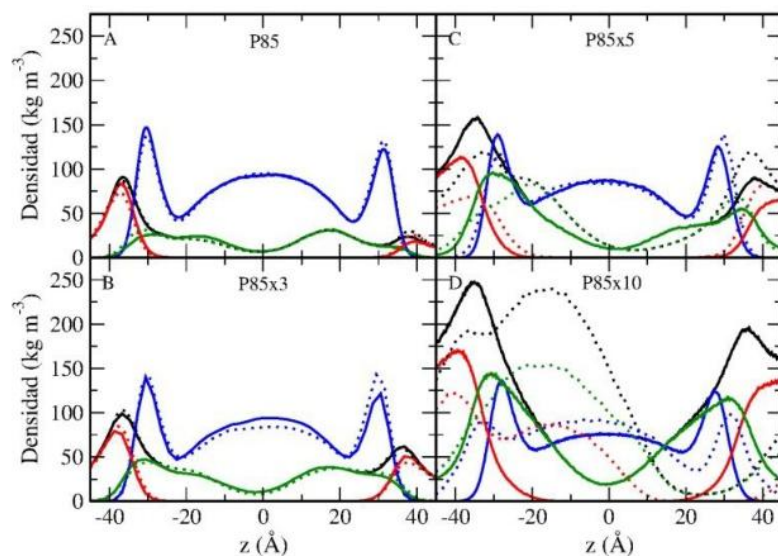


Figura 6.7. Perfil de densidad de SHCG y P85. El unímero se muestra en negro, en rojo PPO y en verde PEO, y en azul SHCG. Condición .W en líneas llenas y .C en líneas punteadas. $z=0\text{\AA}$ corresponde al centro de la fase acuosa.

Por último, estudiamos el efecto de F127 sobre la partición de SHCG en POPC. En este caso, el unímero fue colocado en el centro de la membrana y SHCG en las condiciones .W y .C. En la figura 6.8 mostramos el perfil de densidad de F127 y SHCG en estas condiciones. En ambas simulaciones, F127 adoptó una conformación transmembrana, en acuerdo con los resultados discutidos anteriormente. SHCG se comportó de manera independiente de la condición inicial: particionó, una vez más, entre la interfase bicapa-agua y la fase acuosa.

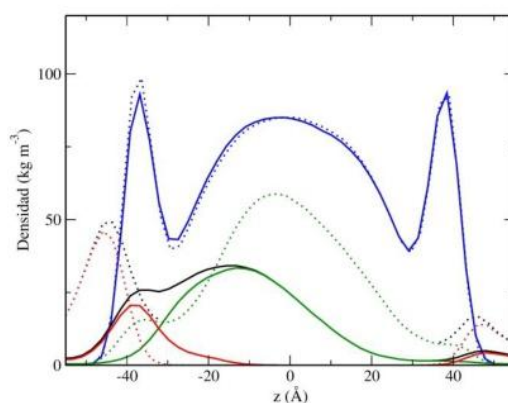


Figura 6.8. Perfil de densidad de SHCG y F127. El unímero se muestra en negro, en rojo PPO y en verde PEO, y en azul SHCG. Condición .W en líneas llenas y .C en líneas punteadas. $z=0\text{\AA}$ corresponde al centro de la fase acuosa.

En cuanto a la permeación, desde la condición .W no observamos cruce de moléculas de SHCG de una monocapa a la otra a través de la región hidrofóbica, ni en presencia de F127 ni de P85. Obtuvimos el mismo resultado en ausencia de polímeros (capítulos 2 y 5).

Una consideración importante al respecto es que la dinámica de SHCG en la bicapa podría ser diferente a la del unímero, por su masa y tamaño, sobretodo al partir desde una condición inestable (.C). Previamente, en el estudio de las micelas (capítulo 5), observamos un comportamiento similar: SHCG convergió rápidamente hacia una distribución bimodal (SHCG-adentro) o interfacial (SHCG-afuera).

CONCLUSIONES

Este capítulo estuvo enfocado en obtener una amplia perspectiva sobre el comportamiento de diferentes co-polímeros en membranas modelo. La importancia de la interacción unímero-bicapa fue reforzada por la evidencia experimental de inhibición indirecta de bombas *ABC* por unímeros de F127 en membranas de líneas celulares de cáncer, provista por Cuestas *et al* [28].

Evaluamos los efectos de la composición de co-polímero y las condiciones iniciales sobre la interacción de cuatro unímeros diferentes con una bicapa modelo de POPC, a través de simulaciones *CG*. Encontramos distintos comportamientos dependiendo de la composición del co-polímero. En la fase acuosa, la mayoría de los unímeros estudiados adoptó una conformación compacta, que constó de un núcleo de PPO rodeado por PEO. Sin embargo, los bloques cortos de PEO de L64 no lograron cubrir el núcleo de PPO, llevando PPO a insertarse en la bicapa. La conformación de L64 fue independiente de la condición inicial.

Desde la condición inicial en el centro de la bicapa, P85 y F38 siguieron el mismo comportamiento que L64: la porción hidrofóbica de PPO se insertó en la bicapa y las colas de PEO se expusieron al agua del mismo lado de la bicapa (conformación en *forma de U*). Por otro lado, F127 se comportó de manera diferente: fue capaz de atravesar la bicapa adoptando una conformación transmembrana. También estudiamos la conformación en *forma de U* para F127 y la conformación transmembrana para P85, ambas fueron estables en la bicapa de POPC. Todavía está en discusión qué conformación adoptarían preferentemente los co-polímeros dentro de la bicapa: *forma de U* o transmembrana [25]. Este comportamiento depende, por ejemplo, del

método de preparación de la mezcla lípido-co-polímero [29, 30].

Nuestros resultados sugieren que, para adoptar la conformación compacta, el co-polímero debería ubicarse inicialmente fuera de la región hidrofóbica de la bicapa. Además, se requiere una longitud de PEO lo suficientemente grande como para cubrir el núcleo PPO condensado, evitando su contacto con agua.

Nos gustaría señalar que la longitud de PPO no es el único factor determinante de la inserción del co-polímero en las membranas. Nuestras simulaciones indican que la longitud de PEO también juega un papel importante en la interacción del unímero, tanto con la membrana como con el agua, de acuerdo con Wang *et al* [31] y Cheng *et al* [32]. Nuestro trabajo aporta nuevos elementos a la discusión en la literatura sobre este tema [24, 32].

Además, la comprensión de las bases moleculares de la interacción unímero-bicapa podría contribuir a revertir el fenotipo *MDR* en células que sobre-expresan bombas de eflujo *ABC* y a mejorar el diseño de sistemas de liberación y la permeación de fármacos [33, 34].

En particular, nuestros resultados preliminares mostraron que, en líneas generales, la permeación y partición de SHCG a través de POPC, fue similar en presencia o ausencia de co-polímeros en su conformación transmembrana. En el caso de afectar la permeación de sumatriptan, F127 y P85 actuarían por un mecanismo diferente a su mera presencia en la bicapa.

En el futuro sería interesante considerar otros mecanismos para estos y otros co-polímeros y analizar exhaustivamente su acción sobre la permeación de sumatriptan y otros fármacos. Habría que evaluar otras condiciones -temperatura, composición de membranas, asociación de fármaco y combinación de co-polímeros-, así como la incorporación del fármaco una vez estabilizado el co-polímero en la bicapa. También sería válido utilizar métodos de determinación de energía libre [35, 36], para evaluar si la partición y/o permeación de sumatriptan está favorecida por la acción coadyuvante de co- polímeros.

Parte de los resultados aquí discutidos fueron enviados para ser publicados en: “*Coarse grained study of Pluronic F127: comparison with shorter co-polymers in its interaction with lipid*

bilayers and self-aggregation in water”, J Mol Structure (MOLSTRUC-D-15-01350). En proceso de revisión.

REFERENCIAS

1. Jansson, J., et al., *The interaction between PEO-PPO-PEO triblock copolymers and ionic surfactants in aqueous solution studied using light scattering and calorimetry*. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2004. **108**(1): p. 82-92.
2. Administration, F.F.a.D., *Inactive ingredient Database*. 2015.
3. Sosnik, A., *Reversal of multidrug resistance by the inhibition of ATP-binding cassette pumps employing “Generally Recognized As Safe” (GRAS) nanopharmaceuticals: A review*. *Advanced drug delivery reviews*, 2013. **65**(13): p. 1828-1851.
4. Jeong, B., et al., *Biodegradable block copolymers as injectable drug-delivery systems*. *Nature*, 1997. **388**(6645): p. 860-862.
5. Hui, S.W. and A. Sen, *Temperature controlled content release from liposomes*. 2005, Google Patents.
6. Nie, S., et al., *Thermoreversible Pluronic F127-based hydrogel containing liposomes for the controlled delivery of paclitaxel*. 2011, *vitro*.
7. Akash, M.S.H. and K. Rehman, *Recent progress in biomedical applications of Pluronic (PF127): Pharmaceutical perspectives*. *Journal of Controlled Release*, 2015. **209**: p. 120-138.
8. Kabanov, A. and E. Batrakova, *New technologies for drug delivery across the blood brain barrier*. *Current pharmaceutical design*, 2004. **10**(12): p. 1355.
9. Batrakova, E.V., et al., *Effects of pluronic P85 unimers and micelles on drug permeability in polarized BBMEC and Caco-2 cells*. *Pharmaceutical research*, 1998. **15**(10): p. 1525-1532.
10. Seelig, A. and G. Gerebtzoff, *Enhancement of drug absorption by noncharged detergents through membrane and P-glycoprotein binding*. 2006.
11. Kabanov, A.V. and V.Y. Alakhov, *Pluronic® block copolymers in drug delivery: From micellar nanocontainers to biological response modifiers*. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 2002. **19**(1).
12. Krylova, O.O. and P. Pohl, *Ionophoric activity of pluronic block copolymers*. *Biochemistry*, 2004. **43**(12): p. 3696-3703.
13. Krylova, O.O., et al., *Pluronic L61 accelerates flip-flop and transbilayer doxorubicin permeation*. *Chemistry-A European Journal*, 2003. **9**(16): p. 3930-3936.
14. Miller, D.W., et al., *Interactions of pluronic block copolymers with brain microvessel endothelial cells: evidence of two potential pathways for drug absorption*. *Bioconjugate chemistry*, 1997. **8**(5): p. 649-657.
15. Batrakova, E.V., et al., *Optimal structure requirements for pluronic block copolymers in modifying P-glycoprotein drug efflux transporter activity in bovine brain microvessel endothelial cells*. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2003. **304**(2): p. 845-854.
16. Batrakova, E.V., et al., *Mechanism of pluronic effect on P-glycoprotein efflux system in blood-brain barrier: contributions of energy depletion and membrane fluidization*. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2001. **299**(2): p. 483-493.
17. Sharma, A.K., et al., *Prevention of MDR development in leukemia cells by micelle-forming polymeric surfactant*. *Journal of Controlled Release*, 2008. **131**(3): p. 220-227.
18. Venne, A., et al., *Hypersensitizing effect of pluronic L61 on cytotoxic activity, transport, and subcellular distribution of doxorubicin in multiple drug-resistant cells*. *Cancer research*, 1996. **56**(16): p. 3626-3629.
19. Lage, H., *ABC-transporters: implications on drug resistance from microorganisms to human cancers*. *International journal of antimicrobial agents*, 2003. **22**(3): p. 188-199.
20. Song, C.K., et al., *Enhanced in vitro cellular uptake of P-gp substrate by poloxamer-modified liposomes (PMLs) in MDR cancer cells*. *Journal of microencapsulation*, 2011. **28**(6): p. 575-581.
21. Schinkel, A.H. and J.W. Jonker, *Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview*. *Advanced drug delivery reviews*, 2003. **55**(1): p. 3-29.
22. Goadsby, P.J., *The pharmacology of headache*. *Progress in Neurobiology*, 2000. **62**(5): p. 509-525.
23. Pascual, J. and P. Muñoz, *Correlation between lipophilicity and triptan outcomes*. *Headache*, 2005. **45**(1): p. 3-6.
24. Hezaveh, S., et al., *Understanding the interaction of block copolymers with DMPC lipid bilayer using coarse-grained molecular dynamics simulations*. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2012. **116**(49): p. 14333-14345.
25. Liang, X., G. Mao, and K.S. Ng, *Effect of chain lengths of PEO-PPO-PEO on small unilamellar liposome*

- morphology and stability: an AFM investigation. Journal of colloid and interface science*, 2005. **285**(1): p. 360-372.
26. Nawaz, S., et al., *Interactions of PEO-PPO-PEO block copolymers with lipid membranes: a computational and experimental study linking membrane lysis with polymer structure. Soft Matter*, 2012. **8**(25): p. 6744-6754.
 27. Firestone, M.A., A.C. Wolf, and S. Seifert, *Small-angle X-ray scattering study of the interaction of poly (ethylene oxide)-b-poly (propylene oxide)-b-poly (ethylene oxide) triblock copolymers with lipid bilayers. Biomacromolecules*, 2003. **4**(6): p. 1539-1549.
 28. Cuestas, M.L., et al., *Lactosylated poly (ethylene oxide)-poly (propylene oxide) block copolymers for potential active targeting: synthesis and physicochemical and self-aggregation characterization. Journal of nanoparticle research*, 2013. **15**(1): p. 1-21.
 29. Castile, J.D., K.M. Taylor, and G. Buckton, *A high sensitivity differential scanning calorimetry study of the interaction between poloxamers and dimyristoylphosphatidylcholine and dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes. International journal of pharmaceutics*, 1999. **182**(1): p. 101-110.
 30. Kostarelos, K., et al., *Molecular structure and conformation in phospholipid vesicles sterically stabilized by (tri)-block copolymers investigated by multi-nuclear magnetic resonance techniques. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and engineering aspects*, 1998. **136**(1): p. 1-9.
 31. Wang, J.-Y., J. Marks, and K.Y.C. Lee, *Nature of interactions between PEO-PPO-PEO triblock copolymers and lipid membranes:(I) effect of polymer hydrophobicity on its ability to protect liposomes from peroxidation. Biomacromolecules*, 2012. **13**(9): p. 2616-2623.
 32. Cheng, C.-Y., et al., *Nature of interactions between PEO-PPO-PEO triblock copolymers and lipid membranes:(II) role of hydration dynamics revealed by dynamic nuclear polarization. Biomacromolecules*, 2012. **13**(9): p. 2624-2633.
 33. Erukova, V.Y., et al., *Effect of ethylene oxide and propylene oxide block copolymers on the permeability of bilayer lipid membranes to small solutes including doxorubicin. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 2000. **1468**(1-2): p. 73-86.
 34. Batrakova, E.V. and A.V. Kabanov, *Pluronic block copolymers: evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers. Journal of Controlled Release*, 2008. **130**(2): p. 98-106.
 35. Marrink, S.J. and H.J.C. Berendsen, *Simulation of water transport through a lipid membrane. Journal of Physical Chemistry*, 1994. **98**(15): p. 4155-4168.
 36. Darve, E. and A. Pohorille, *Calculating free energies using average force. The Journal of Chemical Physics*, 2001. **115**(20): p. 9169-9183.

CAPÍTULO 7: INTERACCIÓN SUMATRIPTÁN-FOSFATIDILCOLINA

MEDIANTE TÉCNICAS EXPERIMENTALES

MOTIVACION

En este capítulo, presentamos algunos resultados experimentales de los sistemas de interés de esta tesis. Estos resultados fueron posibles gracias al apoyo y la colaboración de varios grupos - dirigidos por la Dra. de Paula¹, el Dr. Oliveira² y la Dra. Moglioni³-, así como a la donación del principio activo sumatriptan succinato, por parte del laboratorio LAFEDAR. Esta es una parte muy importante de la tesis porque, como ya comentamos en la metodología, resulta fundamental la retroalimentación entre técnicas experimentales y simulaciones de DM. Cabe destacar aquí el poder predictivo y el nivel de detalle obtenido a partir de las simulaciones que fueron realizadas previamente a los experimentos.

Describiremos brevemente la metodología de dos técnicas biofísicas ampliamente utilizadas para obtener información estructural y dinámica de sistemas biológicos, así como los principales resultados obtenidos. En este caso, discutiremos los resultados obtenidos para vesículas de fosfatidilcolina de huevo (*eggPC*, *EPC*) en presencia de SMT. Por un lado, en conjunto con la Dra. Eneida de Paula, preparamos muestras y realizamos medidas de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) durante su visita a nuestra facultad. Además, gracias al interés del Dr. Oliveira, fue posible realizar mediciones de difracción de rayos X de bajo ángulo (*small angle X scattering*, *SAXS*). A continuación, describimos la preparación de las muestras para las medidas experimentales.

¹ Profesora Dra. Eneida de Paula, Directora del *Departamento de Bioquímica e Biología Tecidual, Instituto de Biologia, Universidade de Campinas*, Brasil.

² Profesor Dr. Cristiano Luís Pinto Oliveira, *Instituto de Física, Universidade de São Paulo*, Brasil.

³ Profesora Dra. Albertina Moglioni, Directora del Departamento de Farmacología y el Instituto de Química y Metabolismo del Fármaco (IQUIMEFA, UBA-CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

Preparación de vesículas lipídicas

En primer lugar, preparamos vesículas multilamelares del lípido *EPC* por la técnica de la película seca (figura 7.1). Para ello, disolvimos el lípido comercial *EPC* puro (*AvantiPolar Lipids*, *Alabaster*, EEUU) en cloroformo (Cl_3CH). Luego tomamos alícuotas -en función de la concentración de las vesículas- para evaporar el Cl_3CH bajo flujo de N_2 . Las películas se dejaron secar para eliminar restos de solvente. Tanto la preparación de las muestras como las medidas de RMN y SAXS se llevaron a cabo a temperatura ambiente.

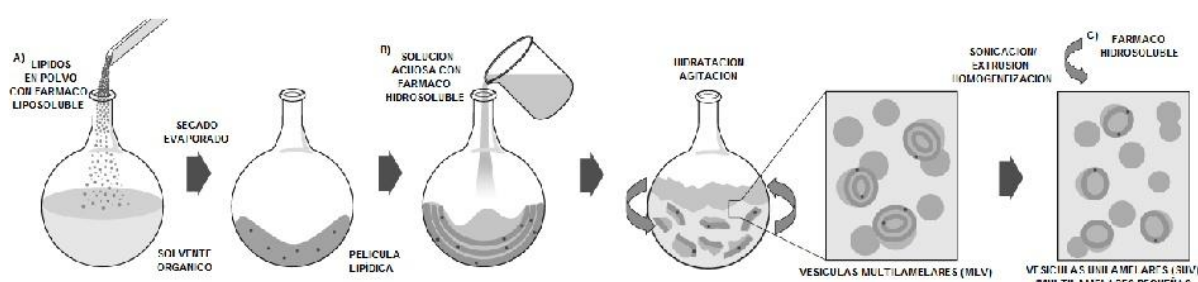


Figura 7.1. Preparación de liposomas. El fármaco SMT puede ser incorporado en la instancia B) durante la preparación de las vesículas, o en C) una vez formadas las vesículas (adaptado de [6]).

Para la técnica de RMN trabajamos con vesículas unilamelares pequeñas de *EPC* 50mM (*small unilamellar vesicles*, *SUV*). En primer lugar, hidratamos la película seca (figura 7.1) con *buffer* fosfato pH7.4 0.2M (liofilizado y resuspendido en agua deuterada). Los solventes y sales utilizados fueron de grado analítico. Agitamos y vortexeamos (3-5 minutos), hasta alcanzar un aspecto blanquecino lechoso, indicativo de la formación de vesículas multilamelares (*multilamellar vesicles*, *MLV*). Las *MLV* fueron luego sonicadas con sonicador de punta (*Vibracells*, *Sonic and Materials*, Danbury) en ciclos intermitentes (30'' sonificado, 30'' enfriando en hielo y agua), hasta obtener muestras de aspecto ligeramente translúcido, compatibles con la formación de *SUV*. Las muestras fueron centrifugadas (10000x, 5 minutos) para eliminar trazas de titanio provenientes de la punta de sonicación. Separamos el sobrenadante y descartamos el precipitado. Una vez obtenidas las *SUV*, en los casos correspondientes, incorporamos el fármaco sumatriptan (SMT) para obtener relaciones molares SMT:*EPC* 1:3, 1:2 y 1:1 (figura 7.1 paso C). El tiempo mínimo de exposición al fármaco, antes de medir, fue de 2hs. Todas las muestras -*SUV*

con y sin fármaco- se almacenaron durante al menos 24hs en heladera. Al día siguiente, de cada muestra conteniendo *SUV* se descartó la fase superior (lechosa) y se separó la fase inferior (translúcida) al tubo de RMN. También se prepararon muestras de SMT en *buffer* pH7.4 deuterado. Por último, todas las muestras se burbujearon con gas inerte (flujo de N_2) antes de medir, para evitar la interferencia del O_2 disuelto en la determinación del tiempo de relajación longitudinal por RMN.

Para la técnica de *SAXS*, a diferencia de RMN, trabajamos con vesículas lipídicas de *EPC* 20mM preparadas por extrusión en el laboratorio de la Dra. de Paula. Para ello, hidratamos la película lipídica seca con buffer fosfato pH7.4 conteniendo el fármaco SMT (relaciones molares SMT:*EPC* 1:3 y 1:2) (figura 7.1 paso B), agitamos y luego extrusamos las vesículas a través de una membrana de 400nm.

Una vez preparadas las vesículas de *EPC* para *SAXS*, nuestros colaboradores del laboratorio de la Dra. de Paula determinaron el tamaño de las vesículas por dispersión dinámica de luz (*dynamic light scattering*, *DLS*) y caracterizaron su forma, aspecto y tamaño por microscopía de transmisión electrónica. Las muestras preparadas fueron vesículas multilamelares (figura 7.2) de un tamaño en el rango de 100-200nm.

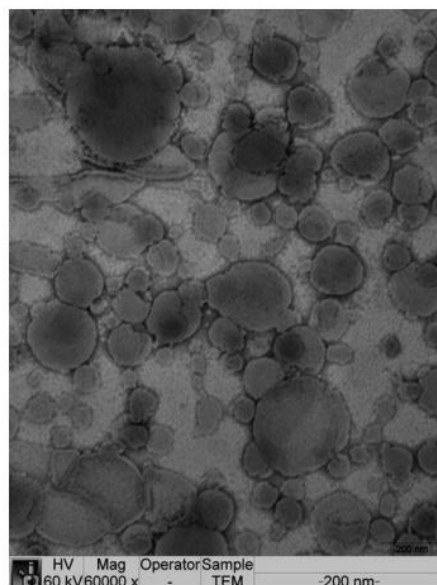


Figura 7.2. Micrografía (60x) de las vesículas multilamelares de *EPC* conteniendo SMT (SMT:*EPC* 1:3) para medidas de *SAXS* (gentileza Lúgía Nunes, Verónica Couto).

En la figura 7.2 mostramos una micrografía de la muestra SMT:EPC 1:3, donde se puede apreciar el tamaño (~200nm, semejante al obtenido por *DLS*), la multilamellaridad y la forma, en general esférica, de algunas vesículas. La presencia de fármaco alteró morfológicamente las vesículas.

Resonancia magnética nuclear (RMN)

RMN es una técnica espectrométrica ampliamente difundida para determinar la estructura lipídica y de proteínas [1]. El fundamento de RMN es bastante complejo, por lo que trataremos de explicarlo de la manera más sencilla posible.

La técnica se basa en las propiedades magnéticas de los núcleos atómicos, que funcionan como sondas brindando información química de los núcleos y su entorno. Las partículas subatómicas tienen un movimiento característico ó *spin*: siendo partículas cargadas, tienen un campo magnético asociado, caracterizado por un momento magnético μ . La dirección y magnitud del número de *spin* I (momento angular intrínseco) y el momento magnético μ están cuantizados y se relacionan mediante la constante giromagnética γ [3]. Los átomos con número de masa y/o protones impares son magnéticamente activos: tienen *spin* nuclear neto y valor de μ no nulo (^1H , ^{13}C , ^{31}P , ^{15}N , etc.). Por ejemplo, ^1H tiene número de neutrones más protones impar (*spin* semi-entero: 1/2) y ^2H (D) tiene número impar de neutrones y de protones (*spin* entero: 1).

Por RMN, entonces, se miden las transiciones nucleares causadas por irradiación en el rango de la radiofrecuencia (MHz). Al igual que otras técnicas espectroscópicas, el fenómeno de resonancia en RMN debe cumplir con ciertas reglas de selección. Los núcleos interactúan con el campo magnético externo absorbiendo radiación y las transiciones producidas por la absorción de energía pueden medirse siempre y cuando satisfagan la condición de resonancia:

$$\Delta E = h \cdot \nu = \frac{h}{2\pi} \cdot \gamma \cdot \vec{B} \quad (\text{Ec. 1})$$

donde h es la constante de Planck, ν la frecuencia de radiación y \vec{B} el campo magnético aplicado.

Producto de la transición al estado excitado, el momento magnético nuclear (magnetización) se

alineada a favor o en contra del campo, en un número de orientaciones discretas ($2I+1$). El núcleo ^1H ($I=1/2$ y γ positivo), por ejemplo, sólo tiene una transición posible entre sus dos niveles de energía. En un espectro de RMN se ven señales en valores de frecuencia (expresada en partes por millón, ppm), obtenidas por transformada de Fourier del decaimiento de los núcleos al estado de equilibrio.

Para un núcleo determinado, por ejemplo ^1H , las señales espectrales aparecen dentro de un rango de frecuencias, ya que el campo que experimenta cada núcleo depende del entorno químico que lo rodea. La diferencia de frecuencia de cada señal -cada núcleo en ambientes diferentes- respecto de un núcleo de referencia, se conoce como desplazamiento químico [3]. La frecuencia depende de la naturaleza del núcleo, la fuerza del campo aplicado, la diferencia de energía entre estados y la distribución electrónica local. Por lo tanto, se pueden distinguir núcleos química y magnéticamente diferentes y resolver las señales provenientes de un gran número de átomos. Además, se puede detectar la partición o desdoblamiento de la señal de un núcleo (o un grupo de núcleos equivalentes). Esta partición de una señal en más de un pico, se debe a la interacción entre los momentos magnéticos de núcleos adyacentes.

Por otro lado, al irradiar un núcleo a distintos intervalos, se puede obtener la constante de relajación longitudinal T_1 , que representa el tiempo en que un núcleo retorna al estado fundamental [3]. El origen de la relajación está relacionado con la interacción de los momentos magnéticos de los núcleos en una molécula con la red de *spins* que la rodea [4]. Por ejemplo, los valores de T_1 varían a lo largo del eje de anisotropía de la bicapa lipídica, por los diferentes ambientes químicos que existen en la membrana [5] y el consecuente grado de libertad de movimiento de los núcleos en esa región.

Mediante la técnica de RMN también se puede obtener información sobre distancias entre núcleos intra o intermoleculares, realizando experimentos de correlación bidimensional. Por ejemplo, el experimento *ROESY* (*rotating frame Overhauser effect spectroscopy*), basado en el efecto Overhauser nuclear (*NOE*) es utilizado para medir correlación homonuclear dada por

interacción dipolar [3, 4]. El efecto *NOE* consiste en la variación de la intensidad de absorción de un *spin* producida por la interacción con otro *spin* por un mecanismo de relajación dipolar. Si los núcleos a los cuales pertenecen esos *spins* están lo suficientemente próximos (2-5Å), se ven perturbados y la relajación de la polarización del *spin* indica la proximidad entre ellos [3]. El espectro obtenido por *ROESY* es una modificación del espectro *NOESY*, que permite diferenciar los picos de correlación cruzada de los picos de identidad (diagonal).

Análisis de resultados: RMN

Realizamos medidas de ^1H -RMN en un equipo *Bruker Biospin AVIII600* (600MHz), con distintas secuencias de pulsos. Este equipo, perteneciente a la Facultad de Farmacia y Bioquímica, cuenta con un magneto *Bruker UltraShield* de 14.1tesla, sistema de *shim Bruker BOSS I*, sonda multinuclear *Smart BBFO* (5mm) con gradiente en z y sintonía automática, y sistema *Bruker Avance III* para la adquisición de datos y control de pulsos.

En primer lugar, mediante espectros protónicos, asignamos los picos de SMT y *EPC*. Estos espectros fueron útiles para determinar el desplazamiento de picos, respecto de las muestras de SMT y *EPC* de referencia. En la figura 7.3 mostramos los espectros superpuestos de SMT (verde), *EPC* (rojo) y la mezcla SMT:*EPC* (1:1) (azul). En la parte superior del espectro mostramos las estructuras de SMT y de uno de los lípidos mayoritarios de *EPC* (palmitoil-oleoil PC) [6]. En letras mayúsculas y minúsculas indicamos los protones y picos correspondientes de *EPC* y SMT, respectivamente.

El espectro de *EPC* mostró buen acuerdo con resultados en literatura [7]. Observamos corrimientos considerables (cambios $>0,05$ ppm) para la mayoría de los picos de SMT (c, d, e, f, g, h, i, j) y para algunos picos de *EPC* (G, H, I'), indicando variaciones en el entorno químico de los núcleos [8].

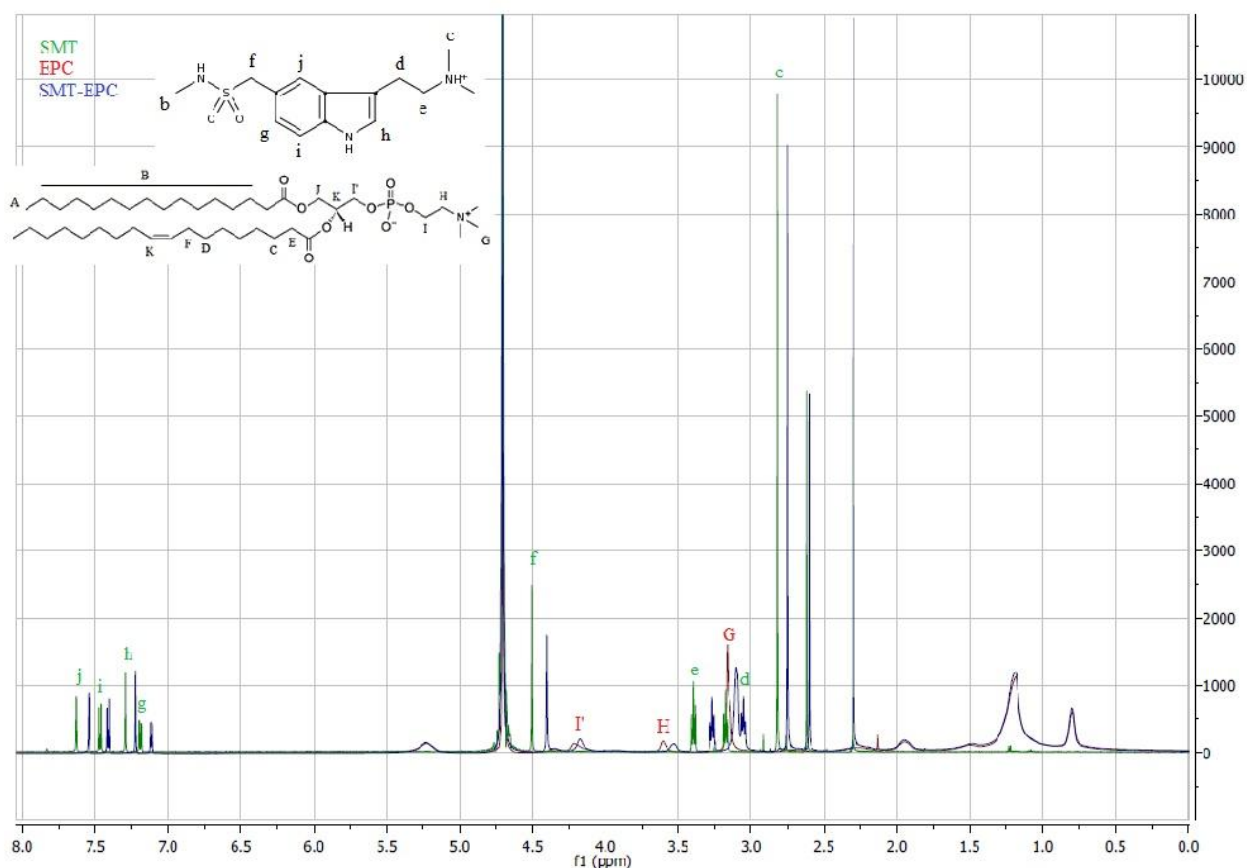


Figura 7.3. Espectros protónicos de las muestras en *buffer* pH 7.4 deuterado: SMT (verde), EPC_{suV} (rojo) y SMT: EPC_{suV} (1:1) (azul). En letras mayúsculas y minúsculas se muestran los picos de EPC y SMT que más se corrieron en la muestra SMT- EPC , respectivamente.

Los corrimientos de SMT fueron hacia valores menores de ppm, indicando un mayor blindaje de los núcleos producido por el cambio de entorno. Este resultado para SMT es comparable con el comportamiento de otros compuestos anfifílicos, que afectan esencialmente, y en la misma dirección, hidrógenos próximos a los grupos colina y fosfato de EPC [8, 9]. Como era esperable, este resultado concuerda con las simulaciones que realizamos para SMT en bicapas de POPC, para las que observamos distribución interfacial de SMT e interacción con los grupos de cabeza polar de POPC.

En la figura 7.4, además, mostramos el efecto de la concentración de SMT sobre estos corrimientos. Expresamos la diferencia de desplazamiento químico (Δppm) entre los espectros de SMT- EPC respecto de los espectros de SMT y EPC puros, para los picos que no se superpusieron en el espectro.

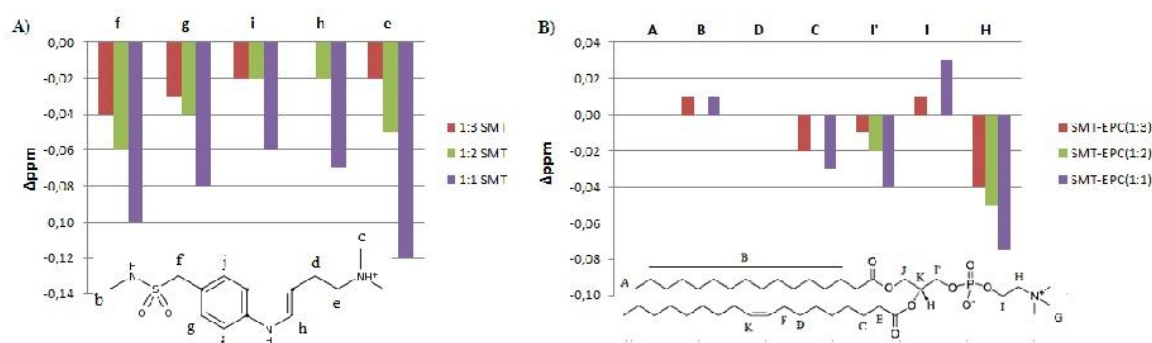


Figura 7.4. Corrimiento de los desplazamientos químicos de las señales de A) SMT y B) *EPC*, a diferente relación SMT:*EPC*: 1:3 en rojo, 1:2 en verde y 1:1 en violeta.

Los picos de SMT se corrieron considerablemente (hasta 0,12ppm) tras la interacción con *EPC*. Para *EPC* observamos corrimientos menores y específicamente para señales en la parte más superficial. Además, vimos que los corrimientos para *EPC* y SMT se acentuaron a alta concentración de SMT, indicando que la interacción fue mayor con el incremento de la cantidad de moléculas de SMT.

Estos resultados indican que SMT experimentó cambios en su entorno químico e interactuó con la bicapa lipídica, mayormente en la región de la cabeza polar (colina y fosfato), en buen acuerdo con los resultados que obtuvimos por simulaciones de DM.

La presencia de SMT en el entorno de las vesículas de *EPC* también puede inducir cambios en la dinámica y puede ser revelado por experimentos de relajación longitudinal. Para ello, determinamos por el método de inversión-recuperación el tiempo de relajación (T_1) para los picos de SMT y *EPC* que no se superpusieron en los espectros unidimensionales. En la figura 7.5 mostramos los valores de T_1 para las muestras puras de SMT y *EPC* y para la mezcla SMT-*EPC* a tres concentraciones. Para *EPC*, los resultados de T_1 mostraron buen acuerdo con otros trabajos en la literatura [7, 8]. Los valores de T_1 son pequeños para los hidrógenos de los grupos de cabeza polar, por las restricciones causadas por la interacción electrostática entre los grupos amina y fosfato de lípidos adyacentes [10]. En la región del glicerol, los hidrógenos tienen movilidad intermedia, y en las cadenas hidrocarbonadas aumenta la movilidad hacia los metilos terminales.

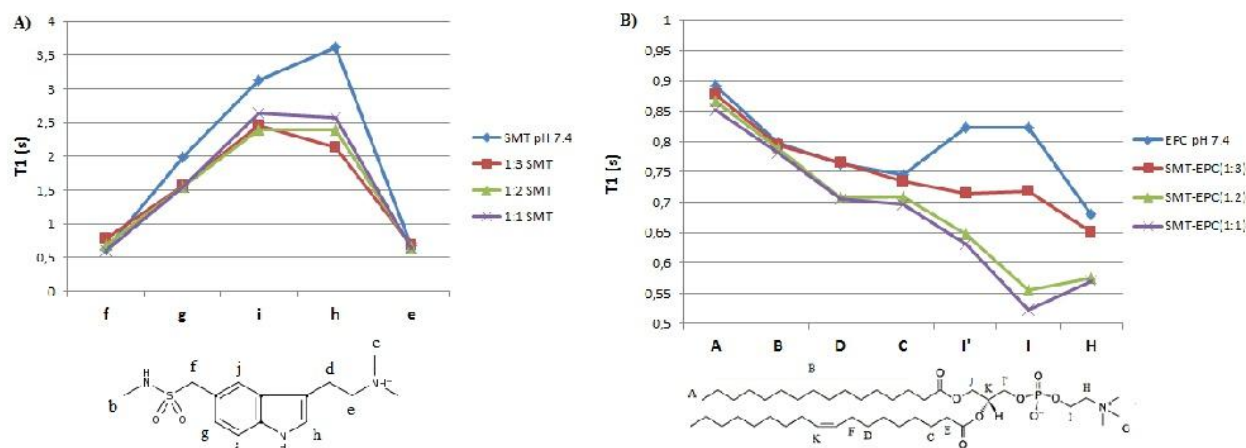


Figura 7.5. Tiempos de relajación longitudinal (T1) para A) SMT y B) *EPC*, a diferente relación SMT:*EPC*: 1:3 en rojo, 1:2 en verde y 1:1 en violeta. En turquesa se muestran los valores de T1 para las muestras puras de SMT y *EPC*.

En la figura 7.5 observamos, en todos los casos, que los valores de T1 de SMT y *EPC* disminuyeron para en las muestras de SMT-*EPC* respecto de las muestras puras. Esta disminución de valores de T1 indica la interacción SMT-*EPC* y la restricción de la movilidad de SMT. En el caso de SMT, el efecto fue más acentuado para los picos correspondientes al anillo indólico. En presencia de SMT, los valores de T1 de *EPC* disminuyeron notablemente a partir del protón I', indicando el efecto de la presencia de SMT sobre la movilidad de las cabezas polares, especialmente a alta concentración del fármaco. Esto sugirió la inserción de SMT en esa región de la bicapa, en buen acuerdo con los cambios de desplazamiento químico. En los capítulos anteriores discutimos un comportamiento similar para SMT observado mediante simulaciones, mostrando preferencia por la interfase de la bicapa de POPC y el agua. A partir de estas simulaciones observamos interacción de SMT a través del anillo indólico (catión- π) con el grupo colina de POPC, y del amino lateral protonado y del grupo amino sulfonamida con el grupo fosfato (puente salino y enlace de hidrógeno, respectivamente). También observamos por DM un mayor número de moléculas de SMT interaccionando con POPC con el aumento de concentración, en buen acuerdo con los resultados de RMN.

Finalmente, medimos el espectro *ROESY* para las muestras puras y las mezclas SMT-*EPC*. En la figura 7.6 mostramos el espectro *ROESY* para la muestra SMT:*EPC* (1:1).

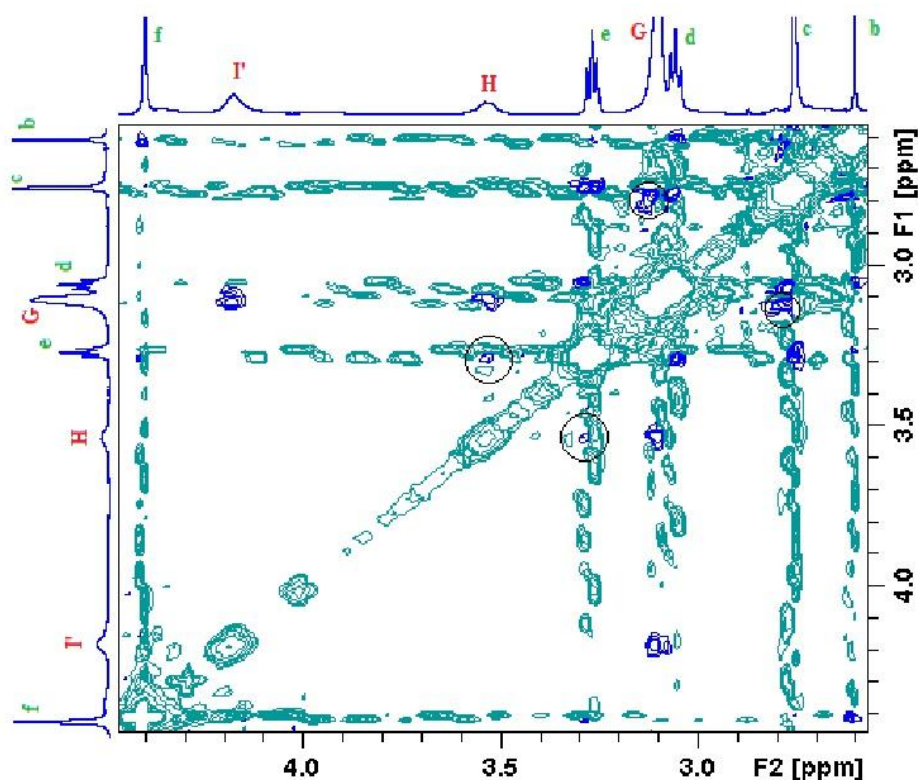


Figura 7.6. Espectro ^1H -ROESY para la muestra SMT:EPC 1:1. En verde se señalan los picos de SMT, en rojo los de EPC y en círculos negros la correlación de picos intermoleculares.

Observamos correlación intermolecular entre los picos c y e (SMT) con G y H (EPC), respectivamente (resaltados con círculos negros). Este resultado confirmó que la interacción del fármaco y las vesículas lipídicas, en estas condiciones, se estableció entre grupos polares: dimetil-amino lateral (SMT) y colina y fosfato (EPC). Sin embargo, a partir de este resultado no podemos descartar la interacción de EPC con otros grupos de SMT, por ejemplo el anillo indólico. Esto se debe a que, por ROESY, se detecta correlación espacial entre núcleos a una distancia muy corta (2-5Å), dificultando la detección de interacciones que involucran estructuras voluminosas o rígidas.

Difracción de rayos X de bajo ángulo (SAXS)

La técnica SAXS pertenece a la familia de técnicas de dispersión de rayos X empleadas para la caracterización de materiales. El equipo utilizado para los experimentos de SAXS, cuenta con una fuente donde se produce el haz de rayos X, que luego es colimado e incide en la muestra (al vacío). La dispersión del haz por la muestra es recogida por el detector.

Las mediciones de SAXS se hicieron utilizando un equipo *NANOSTAR-Bruker* con una fuente *Xenocs*. Las muestras se colocaron en un capilar de diámetro promedio de 1.5mm. Las intensidades fueron corregidas por la dispersión del “blanco”, el capilar vacío y la transmisión de la muestra, luego normalizadas a escala absoluta usando agua como estándar. Para el tratamiento de los datos fue utilizado el paquete *SUPERSAXS* [11]. El modelado de los datos se basó en la deconvolución gaussiana de la dispersión [12].

La intensidad de dispersión ($I(q)$) de un conjunto de capas espaciadas regularmente (por ejemplo, en un sistema multilaminar) está relacionada con la modulación de la densidad electrónica y se describe mediante la convolución de dos funciones:

$$I(q) = \frac{S(q)|P(q)|^2}{q^2} \quad (\text{Ec. 2})$$

$P(q)$ es el factor de forma que describe la forma y el contraste del objeto y $S(q)$ es el factor de estructura, que describe la disposición periódica de los objetos y la interacción entre ellos. El factor q^2 es una corrección para dispersión isotrópica. El factor de estructura para un sistema de multilaminar de periodicidad D (distancia entre capas), se describe mediante la teoría de Caillé modificada

$$S_0(q) = 1 + 2 \sum_{k=1}^{N-1} \left(1 - \frac{n}{N} - k\right) \cos(kqD) \exp \left[- \left(\frac{D}{2\pi} \right)^2 q^2 \eta \gamma \right] (n\pi)^{-\left(\frac{D}{2}\right) q^2 \eta} \quad (\text{Ec. 3})$$

N representa el número de capas correlacionadas en la estructura multilaminar, γ es la constante de Euler y η el parámetro Caillé, relacionado con las constantes elásticas B y K

$$\eta = \frac{q_0^2 k_B T}{8\pi \sqrt{BK}} \quad (\text{Ec. 4})$$

donde K es el módulo de curvatura de la membrana y B el módulo de compresibilidad, a potencial químico constante. El parámetro de Caillé es proporcional a la flexibilidad de la membrana (límite superior teórico de 1,3).

Conociendo el perfil de contraste de densidad electrónica $\Delta\rho$ a lo largo de una bicapa, se puede obtener la función $P(q)$, mediante transformada de Fourier. El perfil electrónico de una bicapa

presenta variaciones suaves, por lo que se puede obtener una descripción detallada de la densidad mediante funciones gaussianas (figura 7.7.A), que describen adecuadamente bicapas simétricas y asimétricas. En este modelo, los parámetros de mayor interés son la periodicidad lamelar D , el espesor de la bicapa δ_m (distancia entre cabezas polares), el parámetro de Caillé η y el número de capas N (figura 7.7.B).

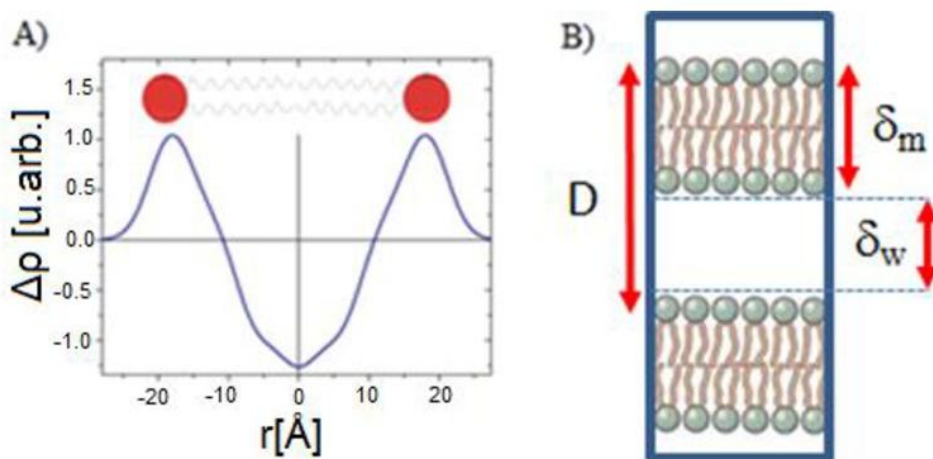


Figura 7.7. A) Perfil de densidad electrónica obtenido por el modelo de 4 gaussianas [13]. B) Esquema de dos bicapas. δ_m es el espesor de la bicapa, δ_w el espesor de la capa de agua o buffer entre bicapas y $D = \delta_m + \delta_w$ la periodicidad lamelar.

Análisis de resultados: SAXS

Nuestros colaboradores del laboratorio del Dr. Oliveira midieron la densidad electrónica por SAXS de vesículas de *EPC* conteniendo SMT, a diferentes concentraciones. En la figura 7.8.A mostramos los datos experimentales obtenidos durante las mediciones. Todos los datos están en escala absoluta, pero para mejor visualización las curvas se espaciaron vertical y logarítmicamente. En la figura 7.8.B mostramos los perfiles de densidad electrónica de las bicapas. Los datos se ajustaron utilizando un modelo de cinco gaussianas. En todos los casos se observó un ajuste satisfactorio (figura 7.8.A). A partir de esta figura se observó la asimetría de las bicapas y la alteración del perfil de densidad causado por la presencia del SMT en las vesículas, en la región de las cabezas polares de *EPC*.

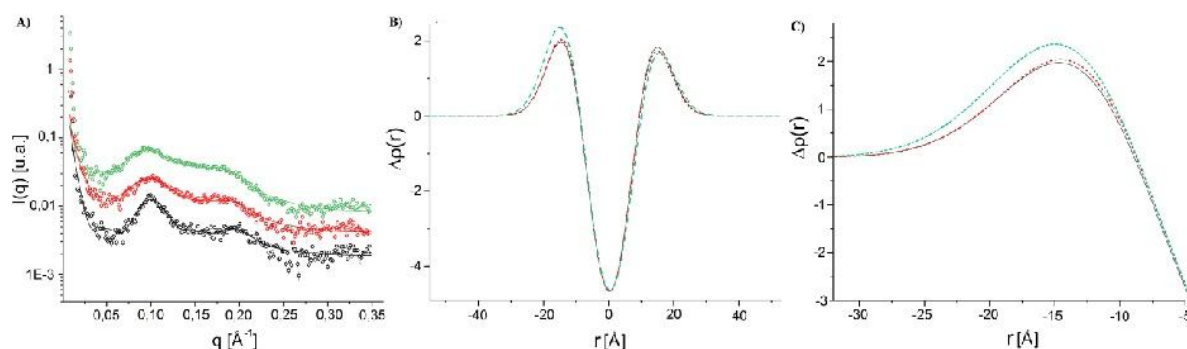


Figura 7.8. A) Datos crudos obtenidos por SAXS, B) densidad electrónica total y C) detalle en la zona de las cabezas polares, para vesículas de *EPC* puras (negro) y conteniendo SMT en relación 1:3 (rojo) y 1:2 (verde).

En la figura 7.8.B se aprecia la diferencia de detalle en la densidad electrónica del sistema obtenida por SAXS (B), al comparar con las simulaciones (capítulo 2). Cabe destacar que las simulaciones permiten tener aún más detalle del perfil de densidad, ya sea de los componentes del sistema (agua, POPC, SMT) como de diferentes grupos separadamente. Por ambos métodos observamos el efecto de SMT en la densidad de las cabezas polares (densidad positiva máxima). En la figura 7.8.C mostramos los perfiles de densidad ampliados en la región de las cabezas polares, poniendo en evidencia el efecto de la presencia del fármaco interaccionando en esa región (condiciones similares SMT:PC 1:3).

Por último, en la tabla 7.1 resumimos los valores de los parámetros utilizados para el ajuste de los datos al modelo gaussiano. Observamos que la incorporación de SMT aumentó la flexibilidad de la bicapa, ya que el parámetro η mostró un aumento con la concentración. Este mismo comportamiento se observó para la distancia interlamelar D . El número N de bicapas correlacionadas mostró poca variación (entre 2 y 3 bicapas en promedio), al igual que el espesor de la bicapa δm . SMT, al tener un tamaño pequeño en relación al tamaño de las cabezas polares en la interfase de *EPC*, no afectó el parámetro δm . Este resultado estuvo en buen acuerdo con el comportamiento observado en POPC por simulaciones DM: SMT no mostró alterar considerablemente el perfil de POPC (capítulo 2).

Tabla 7.1. Valores de los parámetros de interés utilizados en el ajuste

SMT: <i>EPC</i>	$\eta(\text{error})$	D(error) [Å]	N(error)	$\delta m(\text{error})$ [Å]
<i>EPC</i> puro	0.15(6)	62.1(4)	2.8(2)	43(5)
1:3	0.21(6)	63.4(5)	2.5(1)	41(2)
1:2	0.18(5)	65.8(4)	2.3(1)	42(9)

CONCLUSIONES

A partir de técnicas experimentales corroboramos los resultados por simulaciones de DM obtenidos para la interacción de SMT en bicapas modelo de PC. Los resultados de RMN mostraron para los protones de SMT variaciones significativas de desplazamiento químico en presencia de las vesículas de *EPC*, proporcionando evidencias de la interacción, concentración dependiente, con la fase lipídica de dicha membrana modelo. Los corrimientos mayores se observaron para los grupos polares de SMT y de *EPC*, sugiriendo la inserción e interacción de SMT en la región de las cabezas polares de *EPC*. Los valores de T1 brindaron información dinámica de diferentes profundidades de la bicapa, en ausencia y en presencia de SMT. Las diferencias observadas para los valores de T1 y los picos de correlación hallados en el espectro de *ROESY*, revelaron cambios en el entorno para diferentes protones, indicando la interacción SMT-*EPC* y la localización preferencial de SMT en las cabezas polares del lípido. Esta localización podría afectar las interacciones entre los grupos de cabezas polares de lípidos adyacentes, el grado de empaquetamiento molecular y el grado de movilidad de la bicapa.

Por otro lado, fueron analizados los datos de *SAXS* para vesículas de *EPC* con y sin SMT. Los resultados indicaron la formación de vesículas multilamelares para todas las relaciones SMT:*EPC* estudiadas. SMT indujo la formación de bicapas asimétricas y alteraciones en la densidad de las cabezas polares, sugiriendo su posible localización en esa región. También observamos aumento de la flexibilidad de las bicapas e hidratación interlamelar con el aumento de concentración de SMT en las vesículas.

Los resultados experimentales discutidos en este capítulo fueron comparados y complementados

con la información obtenida por simulaciones. Encontramos un buen acuerdo con los cambios observados por DM en bicapas modelo, debido a la presencia de SMT a diferentes concentraciones. Estudiamos en detalle las propiedades dinámicas y caracterizamos ampliamente la interacción de sistemas SMT:PC. Gracias a la sinergia de las técnicas biofísicas utilizadas (RMN, SAXS y simulaciones de DM), finalmente corroboramos la preferencia de SMT por la región interfacial PC-agua y su interacción con grupos polares.

Este trabajo se encuentra en curso. Diversas variables están siendo evaluadas por SAXS. Además, se utilizarán otras técnicas experimentales (calorimetría de titulación isotérmica y microscopía electrónica de transmisión), para una comprensión más global del tema.

REFERENCIAS

1. Gurr, M.I., J.L. Harwood, and K.N. Frayn, *Lipid biochemistry*. 2002: Springer.
2. Edwards, J.C., *Principles of NMR - Overview*. Process NMR Associates LLC, 87A Sand Pit Rd, Danbury CT 06810
3. GEROTHANASSIS, I.P., et al., *Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy: basic principles and phenomena, and their applications to chemistry, biology and medicine*. Chemistry Education Research and Practice, 2002. 3(2): p. 229-252.
4. Gil, V.M. and C.F.d.G.C. Geraldles, *Ressonância magnética nuclear: fundamentos, métodos e aplicações*. 1987.
5. Kuroda, Y. and K. Kitamura, *Intra-and intermolecular proton-proton nuclear Overhauser effect studies on the interactions of chlorpromazine with lecithin vesicles*. Journal of the American Chemical Society, 1984. 106(1): p. 1-6.
6. lipids, a., <http://www.avantilipids.com/>.
7. Fernandes Fraceto, L., et al., *Spectroscopic evidence for a preferential location of lidocaine inside phospholipid bilayers*. Biophysical Chemistry, 2002. 99(3): p. 229-243.
8. Fraceto, L.F., et al., *Differential effects of uncharged aminoamide local anesthetics on phospholipid bilayers, as monitored by 1 H-NMR measurements*. Biophysical chemistry, 2005. 115(1): p. 11-18.
9. Reiner, G.N., et al., *Effects of Gabaergic Phenols on Phospholipid Bilayers as Evaluated by 1 H-NMR*. 2013.
10. Büldt, G. and R. Wohlgemuth, *The headgroup conformation of phospholipids in membranes*. The Journal of Membrane Biology, 1981. 58(2): p. 81-100.
11. Oliveira, C.L.P., et al, *Program package for data treatment, analysis and modeling*. 2009.
12. Oliveira, C.L., et al., *Gaussian deconvolution: a useful method for a form-free modeling of scattering data from mono-and multilayered planar systems*. Journal of Applied Crystallography, 2012. 45(6): p. 1278-1286.
13. Gerbelli, B.B., *Propriedades estruturais e elásticas de fases lamelares: O efeito da composição da membrana*, in Instituto de Física. 2012, USP.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Teniendo en cuenta que la migraña es un problema que afecta a una gran parte de la población, resulta necesario disponer de opciones terapéuticas eficaces y seguras. En esta dirección, el diseño de los triptanos despertó grandes expectativas que, sin embargo, no fueron alcanzadas. El desarrollo de esta familia fue exitoso a la hora de buscar una farmacoterapia selectiva. Sin embargo, se obtuvo menor suerte con los aspectos farmacocinéticos, que garantizan la llegada del fármaco al sitio de acción. Se cree que una de las principales limitaciones de algunos triptanos es que no atraviesan la barrera hemato-encefálica (BHE), por lo tanto no acceden en cantidades significativas a los receptores ubicados en el sistema nervioso central. En esa dirección, una de las motivaciones de esta tesis fue comprender cuales son las razones que dificultan dicho pasaje para contribuir a resolver esta limitación. Una posible estrategia sería vehiculizar los triptanos en sistemas de liberación novedosos.

En primer lugar, estudiamos la interacción de dos triptanos diferentes con membranas modelo, en distintas condiciones, así como la encapsulación del prototipo sumatriptan en micelas poliméricas, siguiendo la propuesta de vehiculización realizada por la Dra. Araújo. Buscando cumplir con nuestros objetivos, usamos modelos precisos y versátiles para realizar simulaciones computacionales con distintos niveles de descripción y estudiar procesos de diferente tiempo de duración en sistemas de diferente tamaño, composición y complejidad.

En general, la predicción de la lipofilicidad de fármacos y compuestos suele basarse en la partición ($\log P$) en el sistema *n*-octanol/agua, emulando de una manera simplista la capacidad de difusión a través de membranas. Por ejemplo, en la literatura la limitación de triptanos para atravesar la BHE se basa en sus valores de $\log P$ en este sistema. En este trabajo estudiamos un sistema más detallado.

En este sentido, esta tesis representa, en nuestro conocimiento, el primer abordaje teórico acerca de la distribución de triptanos en membranas. Obtuvimos resultados originales de la interacción

de estos fármacos con membranas modelo, y su dependencia con distintos factores, con un elevado nivel de detalle atómico y molecular mediante la técnica de Dinámica Molecular. Además, complementamos este abordaje con técnicas biofísicas experimentales, versátiles y poderosas, a partir de las cuales corroboramos y complementamos la información dinámica y estructural obtenida por simulaciones.

A diferencia de los sistemas de dos fases isotrópicas (*n*-octanol/agua), las bicapas usadas en las simulaciones y los experimentos, ofrecieron un ambiente más representativo como sistema biomimético de, por ejemplo, la BHE. Las membranas, siendo sistemas anisotrópicos complejos, permitieron comprender detalladamente y como un fenómeno dinámico, la distribución de compuestos entre diferentes fases. Por ejemplo, considerando explícitamente la presencia de regiones de diferente complejidad y densidad, como la interfase entre las cabezas polares y la fase acuosa, que juega un rol clave en el pasaje de compuestos a través de una membrana.

Mediante distintos abordajes caracterizamos la preferencia por la interfase bicapa lipídica-agua para varios compuestos con esqueleto indólico. Observamos este comportamiento tanto para moléculas endógenas: serotonina y sus precursores de biosíntesis, como para moléculas de diseño con actividad farmacológica: triptanos antimigrañosos, sintetizados y diseñados a partir de serotonina. El anillo aromático de indol (dador de electrones) junto con numerosos grupos sustituyentes polares (dadores y/o aceptores de enlaces de hidrógeno), fueron responsables por la distribución interfacial observada. Esta distribución se vio favorecida y estabilizada por interacciones simultáneas con los grupos de la cabeza polar de fosfatidilcolina.

Este trabajo también permitió explicar diferencias de algunas propiedades físico-químicas entre distintos fármacos propuestas en la literatura. Por ejemplo, ayudó a entender de manera integral la influencia de diversas condiciones (ionización, flexibilidad de la estructura y efectos estéricos, localización inicial del fármaco respecto de la bicapa, efectos cooperativos o de concentración) sobre los posibles mecanismos de pasaje de triptanos a través de membranas.

Los resultados obtenidos pusieron en evidencia la dificultad de moléculas relacionadas con la serotonina para atravesar una bicapa lipídica en un sistema biomimético. El anclaje en la interfase bicapa-agua impide atravesar la membrana, indicando que la interacción con las cabezas polares es el principal factor limitante de su pasaje. Este resultado es compatible con la existencia de sistemas transportadores utilizados por triptófano y serotonina, así 5-HTP podría ser también sustrato de alguno de ellos (al igual que L-dopa). En el caso de los triptanos, la presencia de ciertos grupos funcionales en la estructura indólica, favorece su actividad como agonistas de receptores 5-HT₁ y al mismo tiempo es responsable por su anclaje en la membrana de la BHE. De esta manera, los triptanos precisarían un mecanismo diferente a la difusión o, incluso, la co-administración de un compuesto adyuvante que favorezca su permeación.

Por otro lado, los modelos propuestos nos permitieron confirmar por simulaciones la agregación de los poloxámeros y su capacidad para encapsular el prototipo sumatriptan, en buen acuerdo con los resultados experimentales obtenidos por nuestros colaboradores. Además, encontramos que la composición de poloxámeros y su balance hidrofílico-lipofílico son factores influyentes en el grado de interacción con bicapas lipídicas. Estos resultados sugieren que la elección de uno o varios poloxámeros combinados para formular sistemas de vehiculización y liberación de fármacos, dependerá de los efectos buscados. Las formulaciones aquí propuestas apuntan al uso de materiales modernos, versátiles, termo-reversibles, económicos y seguros, que además de vehiculizar al fármaco, podrían funcionar como adyuvantes de la permeación a través de membranas y barreras.

Los resultados de nuestras simulaciones y experimentos abren muchas puertas. Por un lado, este trabajo de tesis ha generado varias colaboraciones que actualmente están en marcha.

Principalmente, en la retroalimentación entre el trabajo experimental y las simulaciones quedan muchas preguntas por responder y numerosas técnicas y condiciones para seguir ampliando el conocimiento de los sistemas bicapa-triptano y extenderlo al estudio de sistemas micela-triptano.

Por ejemplo, la agregación de naratriptan dentro de la membrana necesita un análisis más amplio y complejo.

En cuanto a los mecanismos de pasaje a través de la BHE, sería muy importante evaluar la afinidad entre varios compuestos y transportadores. Por ejemplo, deberían realizarse estudios adicionales para revelar si el transportador *LAT-1* es responsable del pasaje de 5-HTP en la BHE. Por otro lado, dentro del grupo comenzaron a estudiarse más detalladamente los sistemas poliméricos y la dependencia de su comportamiento con la temperatura. En este sentido, los resultados que se obtendrán a partir de esos sistemas, y en conjunto con los resultados mostrados en esta tesis, serán de gran ayuda en la elección de materiales poliméricos para distintos propósitos. Por ejemplo, permitirán asistir al diseño de formulaciones farmacéuticas novedosas para resolver determinados aspectos farmacocinéticos de los triptanos, en la terapia antimigrañosa vigente. La optimización de estas formulaciones apuntará a maximizar la eficacia y seguridad farmacológicas, minimizar las dosis administradas y la frecuencia de aplicaciones, para finalmente aumentar la adherencia terapéutica.

Uno de los desafíos más importantes que abre este trabajo, es profundizar el estudio de los mecanismos de acción adyuvante en la permeación de fármacos a través de membranas y barreras, favorecida por los poloxámeros, así como su dependencia con distintas condiciones. Por ejemplo, sería útil aplicar métodos de determinación de energía libre para estudiar la partición y/o permeación de estos compuestos a través de membranas.

Y ahora sí, cerrando... Con satisfacción, nos complace que hayamos podido responder muchas preguntas utilizando diferentes técnicas. Y aún más, que se hayan abierto tantas otras, para poder seguir buscando respuestas, abriendo líneas, ideas y, finalmente, para alimentar nuestra curiosidad y aprendizaje.